

# **Mikrostrukturelle und qualitative Veränderungen der Tibialis-posterior-Sehne beim erworbenen Pes planovalgus**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Rebecca Willinghöfer  
geboren am 11.05.1982 in Paderborn

## **Gutachter**

- 1. Prof. Dr. R.-A. Venbrocks, Eisenberg**
- 2. Prof. Dr. W. Lughershausen, Gera**
- 3. PD Dr. U. Irlenbusch, Arnstadt**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.03.2008**

## **Meinen Eltern**

## 1. Abkürzungen

a.d.	aqua dest (destilliertes Wasser)
bp	base pairs (Basenpaare)
CD	Cluster of Differentiation
Col	Collagen (Kollagen)
cDNA	complementary DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent assay ( sog. heterogener Enzym-Immunassay)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EthBr	Ethidium-Bromid
EZM	Extrazelluläre Matrix
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HMG	Hydroxymethylglutaryl
Kol	Kollagen
M.	Musculus (Muskel)
mm.	musculorum (der Muskeln)
MSC	Mesenchymal stem cell (mesenchymale Vorläuferzelle)
N.	Nervus (Nerv)
OP	Operation
mRNA	Messenger-RNA
PBS	Phosphat Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Saline)
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
TBE	Tris-Bor-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline ( Trisgepufferte Saline)
Temp.	Temperatur
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor



### **1.1. Verwendete Einheiten**

A	Ampère
g	Gramm
h	Stunden
l	Liter
min	Minuten
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
sec	Sekunden
U	Unit (Enzymeinheit)
V	Volt

### **1.2. Präfixe**

k	Kilo
m	milli
μ	mikro
n	nano
p	piko

## 2. Inhaltsverzeichnis

<b>1. ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>I</b>
1.1. VERWENDETE EINHEITEN .....	II
1.2. PRÄFIXE .....	II
<b>2. INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>3. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>4. EINLEITUNG.....</b>	<b>4</b>
<b>5. ZIEL.....</b>	<b>7</b>
<b>6. ALLGEMEINE GRUNDLAGEN.....</b>	<b>9</b>
6.1. ANATOMIE DER M. TIBIALIS POSTERIOR-SEHNE .....	9
6.2. DER SEHNENAUFBAU IM ALLGEMEINEN.....	10
6.2.1. Gleitsehnen.....	10
6.3. SEHNENSCHÄDEN UND IHRE HEILUNGSPROZESSE.....	11
6.4. BELASTUNGSABHÄNGIGE DIFFERENZIERUNG DES MESENCHYMALEN GEWEBES .....	13
6.4.1. Mesenchymale Vorläuferzellen .....	14
6.5. EXTRAZELLULÄRE MATRIX (EZM) .....	15
6.5.1. Die Kollagene .....	16
6.5.1.1. Kollagen Typ I .....	17
6.5.1.2. Kollagen Typ II.....	17
6.5.1.3. Kollagen Typ III.....	17
6.5.1.4. Kollagen Typ VI .....	18
6.5.2. Das Proteoglykan Aggrekan .....	18
6.6. DER TRANSKRIPTIONSFAKTOR SOX9 .....	19
6.7. GEFÄßNEUBILDUNG DER SEHNE: VEGF & ENDOSTATIN.....	21
6.7.1. Endoglin (CD105) und die Angiogenese .....	22
6.8. KLASSIFIKATION UND THERAPIE DES PES PLANOVALGUS.....	23
<b>7. MATERIALIEN .....</b>	<b>26</b>
7.1. GERÄTE .....	26
7.2. CHEMIKALIEN.....	27
7.3. ENZYME .....	27
7.4. FÄRBUNGEN .....	28
	III

---

7.5.	ANTIKÖRPER.....	28
7.5.1.	Erstantikörper.....	28
7.5.2.	Zweitantikörper (fluoreszierend).....	30
7.6.	TEST-KITS .....	30
7.7.	VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	30
7.8.	COMPUTERSOFTWARE .....	30
<b>8.</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>31</b>
8.1.	ENTNAHME DER PRÄPARATE .....	31
8.1.1.	„Gesunde“ Vergleichsgruppe.....	31
8.1.2.	Sehne bei Tibialis-posterior-Dysfunktion und Pes planovalgus (Operationspräparate) .....	32
8.2.	HERSTELLUNG VON PUFFERN UND LÖSUNGEN .....	33
8.3	HISTOLOGIE.....	34
8.3.1	Herstellung von Gewebeschnitte.....	34
8.3.2	Vorbehandlung der Gewebeschnitte.....	34
8.3.3	Färbung.....	34
8.3.4	Immunhistologie.....	35
8.3.5	Doppelfärbungen mit der Immunfluoreszenzmethode und anschließender H&E-Färbung .....	36
8.3.6	Auswertung der histologischen Schnitte .....	37
8.4	POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR) .....	39
8.4.1	RNA-Extraktion .....	39
8.4.2	Reverse Transkription .....	39
8.4.3	PCR .....	39
8.4.4	Auswertung der PCR.....	41
<b>9.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>42</b>
9.1.	HISTOLOGISCHE ÜBERSICHTSBESCHREIBUNG DER TIBIALIS-POSTERIOR-SEHNE .....	42
9.1.1.	„Gesunde“ Vergleichsgruppe.....	42
9.1.2.	Operationspräparate .....	44
9.2.	UNTERSUCHUNG DER NEOVASKULARISATION ANHAND DES ZYTOKINS VEGF .....	48
9.2.1.	Immunhistologische Untersuchung.....	48
9.2.1.1.	VEGF mRNA.....	49
9.3.	EXTRAZELLULÄRE MATRIX.....	50
9.3.1.	Immunhistologische Untersuchung der Sehnen der „gesunden“ Vergleichsgruppe...	50
9.3.2.	Immunhistologische Untersuchung der Operationspräparate .....	51

9.3.3.	mRNA-Expression der Kollagene .....	53
9.4.	ANALYSE DER ZELLEN MIT CHONDROZYTÄREM PHÄNOTYP .....	54
9.4.1.	Untersuchung auf das Vorhandensein von Faserknorpel .....	54
9.4.1.1.	Histologische Auswertung der „gesunden“ Sehnen (Vergleichsgruppe) .....	54
9.4.1.2.	Immunhistologische Auswertung der „gesunden“ Sehnen (Vergleichsgruppe) .....	55
9.4.1.3.	Kollagen Typ II mRNA-Expression der „gesunden“ Sehnen (Vergleichsgruppe) .....	57
9.4.1.4.	Histologische Auswertung der Operationspräparate .....	57
9.4.1.5.	Immunhistologische Auswertung der Operationspräparate .....	58
9.4.1.6.	Kollagen Typ II mRNA-Expression der Operationspräparate .....	60
9.4.2.	Untersuchung der Postikussehne auf das Vorhandensein von mesenchymalen Vorläuferzellen .....	60
9.4.2.1.	Immunhistologische Auswertung der „gesunde“ Sehne der Vergleichsgruppe .....	60
9.4.2.2.	Immunhistologische Auswertung der Operationspräparate .....	61
9.4.3.	Untersuchung auf das Vorhandensein von Knorpel-Vorläuferzellen .....	64
9.4.3.1.	Immunhistologische Auswertung der „gesunden“ Sehne der Vergleichsgruppe .....	64
9.4.3.2.	Immunhistologische Auswertung der Operationspräparate .....	66
<b>10.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>68</b>
10.1.	HISTOLOGISCHER AUFBAU .....	69
10.2.	NEOVASKULARISATION .....	70
10.2.1.	CD105-positive Zellen im Rahmen der Angiogenese .....	72
10.3.	EXTRAZELLULÄRE MATRIX .....	73
10.3.1.	Kollagen Typ III .....	73
10.3.2.	Kollagen Typ VI .....	74
10.4.	ANALYSE DER ZELLEN MIT CHONDROZYTÄREM PHÄNOTYP .....	74
10.4.1.	Faserknorpel .....	75
10.4.2.	Mesenchymale Vorläuferzellen (MSCs) .....	76
10.4.3.	Sox9-positive Zellen .....	77
<b>11.</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG .....</b>	<b>78</b>
<b>12.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>81</b>
<b>13.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>88</b>
13.1.	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....	88
13.2.	LEBENS LAUF .....	89
13.3.	DANKSAGUNG .....	90

### 3. Zusammenfassung

Der Pes planovalgus (Knickplattfuß) stellt eine kombinierte Fußfehlstellung dar, bei der es zu einer Lateralabweichung des Vorfußes, einer Abflachung des Längsgewölbes im Mittelfuß sowie einer Valgisation des Rückfußes kommt. Die Ätiologie des Pes planovalgus ist multifaktoriell, wobei die Tibialis-posterior-Sehndysfunktion in der Pathogenese eine der wichtigsten Rollen spielt (Mueller 1991, Thordarson et al. 1995). Es wird angenommen, dass die Tibialis-posterior-Sehne (Postikussehne) in ihrem Verlauf um den Innenknöchel qualitative Veränderungen (Degeneration) erfährt, die zu einem Nachlassen ihrer mechanischen Eigenschaften führen. Trotz der Häufigkeit dieser Fußdeformität gibt es bisher nur wenige Arbeiten, die die mikrostrukturellen und qualitativen Eigenschaften einer Tibialis-posterior-Sehne am gesunden Fuß und am Pes planovalgus direkt miteinander verglichen haben.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb neun Tibialis-posterior-Sehnen von amputierten Unterschenkeln, die als „gesunde“ Vergleichsgruppe dienten, mit zehn Postikussehnenproben, die innerhalb der operativen Versorgung von Patienten mit Knickplattfuß entnommen wurden, verglichen. Ziel war es, die Sehnen hinsichtlich einer qualitativen Veränderung der Zellsammensetzung und der Struktur der extrazellulären Matrix (EZM) zu untersuchen, sowie die Ergebnisse der aktuellen Literatur zur Postikussehne und Sehrendegeneration im Allgemeinen gegenüber zu stellen.

Hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit die histologische Untersuchung der Sehne in den Mittelpunkt gestellt, wobei die Feinanalyse des Gewebes durch Immunhistochemie und den Nachweis von spezifischer mRNA durch PCR erfolgte.

Die Tibialis-posterior-Sehne erfüllt mit ihrem Verlauf um den Innenknöchel, der als Hypomochlium dient, formal die Kriterien einer Gleitsehne und zeigt dementsprechend auch deren typische morphologische Merkmale wie z.B. eingelagerte chondrozytäre Zellen.

Die „gesunden“ Vergleichspräparate der Tibialis-posterior-Sehne imponierten ab dem Innenknöchel Richtung Knochenansatz durch eine quantitative Zunahme dieser Zellen mit Chondrozytenphänotyp, wobei die Zellen meist in charakteristischer Weise perlschnurartig angeordnet waren. Eine direkte Gegenüberstellung der „gesunden“ Vergleichspräparate mit den Tibialis-posterior-Sehnen beim Pes planovalgus wies einen deutlichen Rückgang dieser Zellen auf. Aufgrund dieser Tatsache wurde eine genauere Charakterisierung dieser Zellen durchgeführt. In den vorliegenden Untersuchungen ergaben sich für die chondrozytären Zel-

len unterschiedliche Eigenschaften je nach ihrer Lokalisation im Verlauf der Sehne. Im Bereich der Gleitzone, d.h. im Verlauf um den Malleolus medialis, konnten immunhistochemisch in 7 von 9 „gesunden“ Vergleichspräparaten keine knorpeltypischen Marker wie Kollagen Typ II oder Aggrecan nachgewiesen werden. Auch in der Alcianblau- und Safranin-O-Färbung fanden sich keine Proteoglykane, so dass anzunehmen ist, dass, anders als bisher in der Literatur beschrieben, diese Zellen keinen typischen Faserknorpel mit entsprechender extrazellulärer Matrix darstellen. Weiterführende Untersuchungen der Zellen mit Chondrozytenphänotyp zeigten, dass es sich bei diesen Zellen nicht um mesenchymale Vorläuferzellen handelt, die im Rahmen des Degenerationsprozesses ausdifferenzieren. Zur Identifikation der mesenchymalen Vorläuferzellen wurde die Sehne auf das kombinierte Vorkommen der hierfür charakteristischen Marker CD73, CD90, CD105 und CD166 hin untersucht, von denen lediglich CD105 regelmäßig nachweisbar war. Um auszuschließen, dass die chondrozytären Zellen frühe Knorpelentwicklungsstufen darstellen, wurde die Sehne auf das Vorhandensein des Transkriptionsfaktors Sox9 hin untersucht, der sich in hohen Konzentrationen in mesenchymalen Vorläuferzellen während der Entwicklung ihres chondrogenen Phänotyps nachweisen lässt. Ab dem Malleolus medialis war Sox9 sowohl in schmalen Tenozyten als auch in den chondrozytären Zellen nachweisbar, so dass davon ausgegangen werden muss, dass dieser ubiquitäre Transkriptionsfaktor hier nicht im Rahmen der Chondrogenese auftritt.

Distal des Malleolus medialis waren die immunhistologischen Färbungen für Kollagen Typ II positiv. Sowohl die Alcianblau als auch die Safranin-O-Färbung wiesen Proteoglykane in diesem Sehnenabschnitt nach.

Diese Ergebnisse legen vor dem Hintergrund von Pauwels (1960) kausaler Histomorphogenese nahe, dass es sich bei den chondrozytären Zellen am ehesten um Tenozyten handelt, die sich morphologisch an die zusätzliche Belastung der Sehne mit Druck- und Scherkräften im Verlauf um den Malleolus medialis adaptiert haben. Dies bedeutet aber auch, dass die Zellen mit Chondrozytenphänotyp nicht erst im Rahmen der Degeneration auftreten, sondern bereits physiologisch in der „gesunden“ Sehne vorhanden sind. Die Postikussehne unterscheidet sich damit im Ablauf ihres Degenerationsprozesses deutlich von anderen Sehnendegenerationen, wie z.B. der Supraspinatussehne, deren histomorphologische Veränderungen sich durch eine Ausweitung der Faserknorpelregion auszeichnen (Lotz 2003).

Das regelmäßige Vorkommen der knorpeltypischen Marker kurz vor dem ossären Ansatz lässt darauf schließen, dass es sich hier, wie vielfach in der Literatur beschrieben, um Knorpelzellen handelt, die den an dieser Lokalisation herrschenden Querdruckspannungen entgegenwirken und somit den Funktionszustand der Sehne aufrecht erhalten.

Alle Operationspräparate von Patienten mit Knickplattfuß wiesen typische Anzeichen eines chronisch degenerativ veränderten Gewebes auf. Dabei konnten auch in makroskopisch scheinbar noch intakten Präparaten bereits degenerative Abschnitte nachgewiesen werden. Diese Sehnenabschnitte zeichneten sich durch eine deutliche Zellzahlvermehrung aus. Hervorgerufen wurde diese Zellzahlvermehrung einerseits durch Fibroblasten, andererseits durch eine im Vergleich zur eher hypovaskulären „gesunden“ Sehne massiv hervortretenden Neovaskularisation. Diese neugebildeten Gefäße waren zumeist gruppiert angeordnet und schienen das umliegende Gewebe förmlich zu infiltrieren. Besonders häufig waren solche Gefäßkonglomerate in Rissnähe nachweisbar. Endoglin (CD105), ein bereits in der Tumorforschung anerkannter Gefäßendothelmarker, der sich v. a. auf tumorinduzierten Gefäßen bildet, konnte auch hier speziell auf den neugebildeten Gefäßen nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurde der von Goncalves-Neto et al. (2002) beschriebenen quantitativen Änderungen in der Kollagenzusammensetzung, die u. a. eine Kollagen Typ I-Reduktion zugunsten einer Kollagen Typ III-Zunahme beschreibt, eine immunhistochemische Untersuchung der Lokalisation dieser Kollagene gegenübergestellt. Kollagen Typ III, das sich durch einen verringerten Fibrillendurchmesser und eine erhöhte Dehnbarkeit im Vergleich zu Kollagen Typ I auszeichnet, fand sich vor allem perivaskulär und nahm proportional zur gesteigerten Neovaskularisation in der mechanisch insuffizienten Sehne zu. Zusammenfassend führt dies zu der Annahme, dass die Neovaskularisation zusammen mit dem vermehrten Vorkommen von Kollagen Typ III zu einer Reduktion der mechanischen Qualität des Sehnengewebes führt.

Für den klinischen Alltag ergibt sich aus diesen Ergebnissen, dass von den operativen Maßnahmen, denen eine Raffung der Postikussehne zur Behandlung der Sehendysfunktion bei Pes planovalgus zugrunde liegt, Abstand genommen werden sollte, da der chronisch degenerative Prozess auch makroskopisch gesundes Gewebe mit großer Wahrscheinlichkeit bereits betroffen hat.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen erscheint es eher sinnvoll, die verstärkte Neovaskularisation, die die mechanische Schwächung der Sehnengrundstruktur einleitet, als therapeutischen Angriffspunkt ins Therapiekonzept aufzunehmen. Für eine solche Sklerosierungstherapie werden in der Literatur für die chronische Achillessehnentendinose und Patellartendinose erste erfolgsversprechende klinische Studien beschrieben (Ohberg und Alfredson 2002, Hoksud et al. 2006).

## 4. Einleitung

Der Pes planovalgus (Knickplattfuß) stellt eine kombinierte Fußfehlstellung dar, bei der es zu einer Lateralabweichung des Vorfußes, zu einer Abflachung des Längsgewölbes im Mittelfuß sowie einer Valgisation des Rückfußes kommt (Abb.1 & 2).



Abb. 1: Klinischer Befund eines Pes planovalgus mit kompletter Aufhebung der medialen Längswölbung



Abb. 2: Klinischer Befund einer Knick-Plattfuss-Deformität rechts (R) im Stadium 2 mit Rückfußvalgus, prominentem medialen Fußrand und einer Abduktion des Mittelfußes.

Es wird zwischen einem angeborenen und erworbenen Knickplattfuß unterschieden. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem erworbenen Pes planovalgus des Erwachsenen, der zu den häufigsten Fußfehlstellungen gezählt wird. Besonders oft findet sich der Knickplattfuß bei Frauen, die älter als 42 Jahre sind (Zwipp et al. 2000).

Bereits 1969 postulierten Kettlekamp und Alexander die Tibialis-posterior-Sehndysfunktion als mögliche Ursache der Knickplattfußentstehung. Die Funktion des M. tibialis posterior innerhalb des normalen Gangzyklus liefert die biomechanische Erklärung hierzu. Während des Gangzyklus sorgt die Tibialis-posterior-Sehne als funktioneller Antagonist der Mm. peronei, v.a. des M. peroneus brevis, für eine Inversion des Rückfußes beim Fersenauftritt und verhindert durch die Stabilisation der transversalen Fußwurzelgelenke („Locking in-Mechanismus“) eine Vorfußabduktion. Auf diese Stabilisation aufbauend kann durch Anspannen der Wadenmuskulatur die Last auf den Vorfuß übertragen werden, und es kommt zu einem kraftvollen Zehenabstoß (Fuhrmann et al. 2005).

Fällt diese Stabilisation durch einen Ausfall des M. tibialis posterior weg, entsteht zunächst ein valgischer Rückfuß, der über die daraus resultierende vermehrte Belastung der nun insta-



bilen Fußwurzel das Versagen der kapsuloligamentären Strukturen der medialen Fußsäule induziert (Fuhrmann et al. 2005). Dies betrifft insbesondere die beiden Anteile des Lig. calcaneonavicular plantare, die Plantarfaszie, das Lig. plantare longum und den oberflächlichen Anteil des Lig. deltoideum. Unterstützt wird dieser Prozess durch die weiterhin bestehende intakte Funktion der Peroneusmuskulatur.

Wenngleich allgemein akzeptiert ist, dass die Tibialis-posterior-Sehne den muskulären Hauptstabilisator der medialen Fußlängswölbung darstellt (Mueller 1991, Thordarson et al. 1995, Van Boerum und Sangeorzan 2003), ist davon auszugehen, dass Veränderungen der Tibialis-posterior-Sehne nicht die alleinige Ursache für den Knickplattfuß sind. Yeap et al. untersuchten 2001 17 Patienten nach einem Transfer der Tibialis-posterior-Sehne hinsichtlich der Entstehung eines Pes planovalgus. Lediglich 20% entwickelten diesbezüglich charakteristische Merkmale, so dass davon ausgegangen werden muss, dass es noch weitere das Fußgewölbe destabilisierende Faktoren geben muss. Van Boerum und Sangeorzan (2003) führen hier z. B. eine extreme Anspannung des M. triceps surae als zusätzlichen destabilisierenden Faktor an.

Klinisch berichten die betroffenen Patienten über einen diffusen Schmerz im Bereich des medialen Fußrandes, einen Druckschmerz im Bereich des Malleolus medialis sowie im Verlauf der Tibialis-posterior-Sehne. Beim weiteren Fortschreiten der Erkrankung kommen Schmerzen im Bereich des Rückfußes hinzu, die Belastbarkeit des Fußes wird deutlich eingeschränkt. Je nach Schweregrad der Erkrankung ist ein einbeiniger Zehenstand nicht mehr möglich. Nur in einzelnen Fällen findet sich in der Anamnese der erkrankten Personen ein Trauma, das eine Sehnenruptur erklären würde. Hinzu kommt, dass sich nur in den wenigsten Fällen intraoperativ eine rupturierte Sehne zeigte (Jahss 1982), so dass in der Mehrzahl der Fälle davon ausgegangen wurde, dass ursächlich eine „Dysfunktion“ der Muskel-Sehnen-Einheit vorlag, wobei neurologische Defizite der muskulären Ansteuerung frühzeitig als Ursache ausgeschlossen werden konnten. Es wird demnach angenommen, dass strukturelle Veränderungen der Postikussehne zu einer mechanischen Dekompensation mit Überdehnung der Sehne führen. Die daraus resultierende Elongation des Sehnenabschnitts würde dann die Dysfunktion erklären. Da sich makroskopisch nur in einem geringen Teil der Knickplattfüße Auffälligkeiten der Postikussehne zeigten, muss dabei die Ursachenforschung für die strukturellen Veränderungen auf mikrostruktureller und molekularer Ebene ansetzen (Jahss 1982).

Obwohl der Knickplattfuß eine der häufigsten Fußdeformitäten darstellt, gibt es nur wenige Arbeiten, die sich mit der Ursachenforschung beschäftigen. Diese nachfolgend angegebenen

Arbeiten präsentieren die unterschiedlichsten pathogenen Prozesse als Erklärungsansätze für die Entstehung der Dysfunktion, so dass davon ausgegangen werden muss, dass es sich am ehesten um eine multifaktorielle Pathogenese handelt. Gemeinsam ist dabei allen Studien die besondere Bedeutung des Verlaufes der Sehne um den Innenknöchel sowie die klinische Beobachtung, dass sich Rupturen meist distal des Innenknöchels finden.

Kettelkamp und Alexander sahen 1969 einen entzündlichen Prozess der Sehne als Ursache an. Aktuell geht die Literatur aber eher von einem, wie auch von Mosier et al. (1999) beschriebenen, chronisch degenerativen nicht-entzündlichen Prozess aus. Frey et al. (1990) fanden eine Zone der Hypovaskularisation in der Regio retromalleolaris, die sie als Erklärung für das anscheinend verminderte Reparaturpotential der Sehne ansahen. Petersen et al. postulierten 2004 das Vorkommen von Faserknorpel im Verlauf um den Innenknöchel als lokale Schwächung der Sehne gegenüber Zugkräften und somit als potentielle Ursache für die Sehnendegeneration. Eine Änderung der Kollagenzusammensetzung betrachteten Goncalves-Neto et al. (2002) als destabilisierenden Faktor. Des Weiteren wurden diverse anatomische Varianten, wie das Vorhandensein eines zusätzlichen Os naviculare bzw. eines Sesambeines im ossären Ansatzbereich der Tibialis-posterior-Sehne, als destabilisierende Faktoren angenommen (Moriggl et al. 2003). Klinische Studien haben ergänzend hierzu mehrere Faktoren beschrieben, die die Sehnendegeneration begünstigen sollen, wie z. B. Übergewicht, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Medikamente (z.B. Glukokortikoide) sowie systemisch entzündliche Erkrankungen (z. B. rheumatoide Arthritis) (Holmes und Mann 1992, Van Boerum und Sangeorzan 2003, Fuhrmann et al. 2005).

Bisher konnte keine Studie eine zufrieden stellende Erklärung für die Pathogenese liefern und nur wenige Arbeiten haben die gesunde Tibialis-posterior-Sehne direkt mit der krankhaft veränderten Sehne verglichen. Hinzu kommt, dass viele histologische Ergebnisse der älteren Arbeiten methodische Unzulänglichkeiten, z.B. fehlende immunhistologische Absicherungen, aufweisen. Deshalb soll in dieser Arbeit ein direkter Vergleich der gesunden mit der krankhaft veränderten Sehne vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur zur Postikussehne und Sehnendegeneration im Allgemeinen stattfinden. Dabei ist die Suche nach der Ursache für die Sehnendegeneration eng verknüpft mit der daraus resultierenden therapeutischen Konsequenz.

## 5. Ziel

Dem Knickplattfuß liegt eine multifaktorielle Pathogenese zugrunde, in der der Tibialis-posterior-Sehnenfunktion eine zentrale Rolle zukommt. Als Ursache für die Dysfunktion werden strukturelle Veränderungen in der Sehne angesehen, die zu einer mechanischen Überdehnung mit nachfolgendem strukturellen Versagen führen.

Trotz des häufigen Auftretens dieser Fußfehlstellung gibt es bisher nur wenige Arbeiten, die die gesunde Postikussehne direkt mit der mechanisch insuffizienten Sehne verglichen haben. Aus diesem Grunde ist die Fragestellung dieser Arbeit folgendermaßen zu formulieren:

- Durch welche histologisch darstellbaren strukturellen Eigenschaften unterscheidet sich die mechanisch insuffiziente von der gesunden Tibialis-posterior-Sehne?
- Lassen sich aus den gewonnenen Ergebnissen Konsequenzen für die Behandlung des Knickplattfußes ableiten?

Da die einzelnen Studien über die Sehnen Degeneration unterschiedlichste Veränderungen der mechanisch insuffizienten Sehne beschreiben, wie z. B. die Gefäßversorgung, die Kollagenszusammensetzung, das Vorhandensein von Faserknorpel usw., sollen auch diese Gesichtspunkte vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur berücksichtigt werden.

Besonders hervorgehoben werden soll hier ein Vergleich mit der Rotatorenmanschette. Für die chronische Degeneration der Supraspinatussehne, die analog zur Postikussehne ebenfalls um ein Hypomochlion, dem Tuberculum majus, verläuft, wird die Pathogenese in der aktuellen Literatur ausführlich diskutiert. So konnte die Bursa subacromialis mit ihren sezernierten Zytokinen als Induktor der sich in der Sehne ausweitenden Faserknorpelregion gefunden werden. Da durch die Ausweitung der Faserknorpelregion eine im Vergleich zur gesunden Sehne resultierende Schwächung der mechanischen Eigenschaften der Sehne entsteht, wird diese für die chronische Insuffizienz der Sehne verantwortlich gemacht. Ein Entfernen der Bursa stellt somit eine kausal orientierte Therapieoption dar. Durch die Tatsache, dass sowohl die Supraspinatussehne als auch die Tibialis-posterior-Sehne Gleitsehnentypen entlang eines Hypomochlions darstellen, kann diesen beiden Sehnen eine gewisse Ähnlichkeit in ihrer mechanischen Belastung unterstellt werden.

Besonderes Augenmerk bei den vorliegenden Untersuchungen gilt den chondrozytären Zellen der Postikussehne, die im Zusammenhang mit der Gleitzone stets als Faserknorpel beschrieben werden, bisher aber nur in wenigen Arbeiten mit immunhistochemischen Markern genauer untersucht wurden.

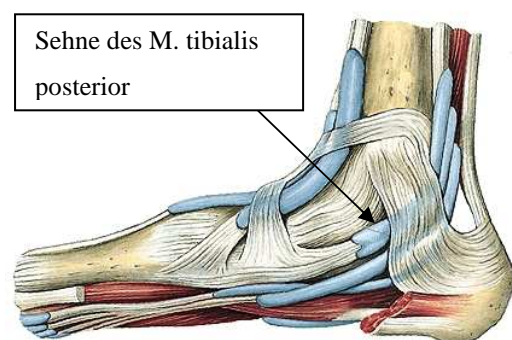
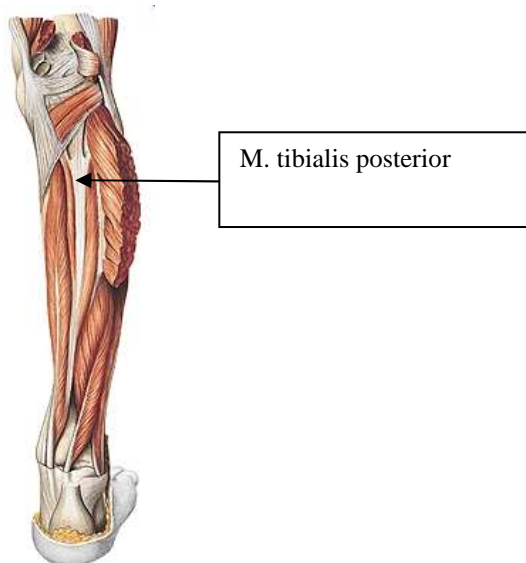
Zusammenfassend ergaben sich somit aus den oben genannten Aussagen folgende Fragestellungen:

- Wie sind die chondrozytären Zellen der gesunden Postikussehne charakterisiert und weisen sie Unterschiede in einer mechanisch insuffizienten Sehne auf?
- Handelt es sich hierbei um physiologischerweise vorkommenden Faserknorpel oder um frühe Knorpelentwicklungsstufen, die noch nicht ausdifferenziert sind bzw. sind diese Zellen mesenchymale Vorläuferzellen, die im Rahmen der Degeneration ausdifferenzieren?
- Ist innerhalb der Postikussehne im Bereich der bevorzugten Rupturstelle verstärkt Faserknorpel vorhanden?
- Welche Rolle spielt die mikroskopisch bei degenerativ veränderten Sehnen erkennbar verstärkte Vaskularisation? Findet sich eine verstärkte Neovaskularisation?
- Gibt es Unterschiede in der kollagenen Architektur der mechanisch insuffizienten Sehne im Vergleich zu den „gesunden“ Sehnen?

## 6. Allgemeine Grundlagen

### 6.1. Anatomie der M. tibialis posterior-Sehne

Der M. tibialis posterior (kurz: Postikus) wird vom N. tibialis innerviert und entspringt zum Großteil von der Membrana interossea cruris, des Weiteren vom tiefen Blatt der Fascia cruris, vom proximalen medialen Teil der Fascies posterior tibiae sowie von der medialen Facette der Fascies posterior fibulae. Während seines Verlaufes nach distal unterkreuzt der Postikus im unteren Drittel der Wade den M. flexor digitorum longus und bildet dadurch das sog. Chiasma crurale. Mit doppelter Fiederung strahlt er etwa handbreit oberhalb des medialen Malleolus in seine Ansatzsehne ein. Ca. 5 cm oberhalb des Malleolus medialis wird seine Sehne von einer eigenen Sehnenscheide umhüllt, die sie bis zu ihrem Ansatz behält. Im weiteren Verlauf zieht sie durch den Sulcus malleolaris tibiae, wo sie durch das Retinaculum mm. flexorum gesichert wird, um den Innenknöchel als Hypomochlion. Durch das vordere Sehnensfach, das proximal durch den Sulcus malleolaris tibiae und distal durch das Retinaculum mm. flexorum und das Lig. deltoideum gebildet wird, zieht die Tibialis-posterior-Sehne in Richtung auf den medialen Fußrand, um sich dort aufzuteilen (Abb.3). Der Großteil der Fasern inseriert an der Tuberositas ossis navicularis. Die restlichen Fasern spalten sich fächerförmig auf und setzen an den Basen der Ossa metatarsalia II-IV, dem Os cuboideum sowie an den Ossa cuneiformia intermedium und laterale an (Rauber und Kopsch 1998).



Der mediale Retromalleolarraum (Regio malleolaris medialis/Regio retromalleolaris) enthält von vorn nach hinten: die Sehne des M. tibialis posterior, die Sehne des M. flexor digitorum longus, die Vasa tibialia posteriora, den N. tibialis und ganz hinten in der Tiefe die Sehne des M. flexor hallucis longus.

Abb. 3: Übernommen aus Sobotta – Atlas – Anatomie (CD-ROM 20. Auflage), © Urban & Schwarzenberg 1997

## 6.2. Der Sehnenaufbau im Allgemeinen

Sehnen dienen der Kraftübertragung zwischen Muskel und Knochen. Bei der Einwirkung von äußeren Kräften fungieren sie als Puffer, um Muskelschäden vorzubeugen. Tenoblasten und Tenozyten bilden 90-95% der zellulären Bestandteile der Sehne und stellen besonders gestaltete Fibroblasten dar. Tenozyten synthetisieren die verschiedenen Kollagentypen, bei denen Kollagen Typ I mit 65-80% dominierend ist, sowie die restlichen Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Elastin und Proteoglykane. Der Sauerstoffverbrauch liegt in der Sehne 7,5-mal niedriger als im Muskel. Dieser reduzierte Metabolismus soll für den langsamen Heilungsprozess in Sehnen verantwortlich sein (Sharma und Maffulli 2006).

Die Sehne wird von einem flächenhaften Bindegewebe, dem sog. Peritendineum externum umgeben. Das Peritendineum internum enthält die die Sehne versorgenden Gefäße und Nerven und unterteilt die Sehne in Sekundärbündel. Faserarme Bindegewebssepten gliedern die Sekundärbündel in kleine Primärbündel auf, die aus Kollagenfaserbündeln und eingelagerten Tenozyten bestehen (Leonhardt 1985).

Am knöchernen Ansatz der Sehne wird häufig eine Übergangszone beschrieben, die aus Faserknorpel besteht (Rüther 1999). Faserknorpel zeichnet sich in Abgrenzung zum hyalinen Knorpel durch einen neben dem knorpeltypischen Kollagen Typ II großen Anteil an Kollagen Typ I aus. Die Kollagene sind im Faserknorpel im Gegensatz zum hyalinen und elastischen Knorpel nicht mehr maskiert, da die Knorpelgrundsubstanz nur noch spärlich vorhanden ist. Die zellarmen Chondrone liegen weit auseinander gedrängt zwischen den Faserbündeln und sind oft in Reihen angeordnet. Der schmale Knorpelhof lässt sich gut mit basischen Farbstoffen anfärben. Im Unterschied zum elastischen Knorpel lassen sich im Faserknorpel keine elastische Fasern nachweisen. Neben dem Ansatzbereich von diversen Sehnen und Bändern am Knochen findet sich Faserknorpel im Gelenkknorpel des Kiefergelenkes und Sternoklavikulargelenkes, in den Disci et Menisci articulares, dem Labrum glenoidalis sowie dem Annulus fibrosus der Disci intervertebrales (Miehe 1998, Milz et al. 1998).

### 6.2.1. Gleitsehnen

Gleitsehnen zeichnen sich dadurch aus, dass ihre Wirkungsrichtung nicht mit dem Verlauf des Muskels übereinstimmt (Rauber und Kopsch 1987). Die Richtungsänderung resultiert aus der Tatsache, dass Gleitsehnen in ihrem Verlauf entweder um einen Knochen oder ein Retinaku-

lum herumziehen. Der Knochen bzw. das Retinakulum fungieren dabei als Widerlager, das auch Hypomochlion genannt wird (Rauber und Kopsch 1987). Die Postikussehne erfüllt daher mit dem Malleolus medialis als Hypomochlion definitionsgemäß die Kriterien einer Gleitsehne.

Gleitsehnern zeigen histologisch Auffälligkeiten im Vergleich zu normalen Zugsehnern. Im Sehnenabschnitt, der um das Widerlager herum verläuft, sind Zellen mit Chondrozytenphänotyp in das Sehnengewebe eingelagert, die Rauber und Kopsch (1987) als Knorpelzellen bezeichnen. Als Begründung für das Auftreten dieser Zellen wird die nach Pauwels kausaler Histomorphogenese (1960) resultierende Beanspruchung der Sehne mit Schub- und Druckkräften angeführt, die weiter unten näher erläutert werden soll. Des Weiteren findet sich in der Sehnenregion, die dem knöchernen Widerlager anliegt, sowohl ein erhöhter Gehalt an Glykosaminoglykanen als auch Kollagenfibrillen, die sich durch einen geringeren Durchmesser und eine engere Periodizität als in typischen Zugsehnern auszeichnen.

### **6.3. Sehnenschäden und ihre Heilungsprozesse**

Es werden zwei Arten von Sehnenverletzungen unterschieden: das akute Trauma und die chronische Degeneration. Da die Postikussehnenveränderung im Rahmen der erworbenen Knickplattfußdeformität in die Kategorie der chronischen Degeneration fällt und keiner der Patienten mit Pes planovalgus, deren Sehnenproben in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, von einem akuten Trauma berichtet hat, soll im folgenden lediglich auf die chronische Degeneration eingegangen werden.

Sehnen reagieren auf wiederholte Überbeanspruchung entweder mit einem entzündlichen oder einem degenerativen Prozess, bzw. mit einer Mischung aus beiden. Durch den relativ geringen Metabolismus innerhalb der Sehne kann dabei durch repetitive Mikrotraumen ein Zustand entstehen, in dem nicht mehr ausreichend Zeit für einen effektiven Heilungsprozess bleibt, so dass die Sehne immer anfälliger für erneute Verletzungen wird. Als Auslöser für die Degeneration werden die verschiedensten Faktoren diskutiert, wie z.B. Hypoxie mit entsprechenden ischämiebedingten Schäden, oxidativer Stress, vermehrte Apoptose, Hyperthermie, inflammatorische Faktoren sowie eine veränderte Expression der Matrixmetalloproteinasen (Sharma und Maffulli 2006).

Wirth und Carls (2000) beschreiben drei verschiedenen Stadien der Degeneration:

- 1. Stadium: Dieses Stadium findet sich vor allem in Sehnen von jüngeren, sportlichen Patienten unter 25 Jahren. Es zeichnet sich durch Ödembildung und Einblutungen in die Sehne aus. Die dadurch hervorgerufenen Beschwerden sind reversibel.
- 2. Stadium: Kommt es zu repetitiven Mikrotraumen, beginnt ein chronisch degenerativer Prozess. Die aus diesem Vorgang resultierenden Beschwerden sind nicht immer reversibel und können lange anhalten. Betroffen sind zumeist Patienten zwischen 25 und 40 Jahren.
- 3. Stadium: Patienten in diesem Stadium sind fast immer über 40 Jahre alt. Durch eine fortschreitende Degeneration entstehen erste partielle bis totale Rupturen. Die damit einhergehenden Beschwerden sind nur noch in den seltensten Fällen reversibel.

Die Regeneration der Sehne findet nach Sharma und Maffulli (2006) in drei, sich überlappenden Phasen statt:

- 1. Phase = Entzündungsphase: Innerhalb der ersten 24 Stunden kommt es zu einem Einwandern von Monozyten und Makrophagen, die das nekrotische Material beseitigen. Es werden vermehrt vasoaktive und chemotaktische Faktoren ausgeschüttet, wodurch es zu einer Aktivierung der Angiogenese und des Stoffwechsels der Tenozyten kommt. Es beginnt eine vermehrte Bildung von Kollagen Typ III (Murphy et al. 1994).
- 2. Phase = Umbauungsphase: Nach wenigen Tagen beginnt der organisierte Umbau des verletzten Gewebes; die Kollagen Typ III – Produktion erreicht ihren Höhepunkt.
- 3. Phase = Modellierungsphase: Dieses Stadium beginnt ungefähr sechs Wochen nach dem Trauma und lässt sich noch einmal in eine Konsolidierungs- und eine Reifungsphase differenzieren. Während des Konsolidierungsstadiums verschiebt sich der Schwerpunkt im Heilungsprozess von den zellulären Faktoren zur Faserbildung. Der Metabolismus der Tenozyten wird gesteigert, so dass eine vermehrte Bildung von Kollagen Typ I entsteht. Das sich ab der 10. Woche anschließende Reifungsstadium kann bis zu einem Jahr andauern und zeichnet sich durch einen Rückgang der Vaskularisation sowie des Stoffwechsel der Tenozyten aus. Es entsteht nun die endgültige Narbe im Sehnengewebe.



## 6.4. Belastungsabhängige Differenzierung des mesenchymalen Gewebes

Die Sehne wird entwicklungsgeschichtlich dem Binde- und Stützgewebe zugerechnet. Die Sehnenzellen gehen embryologisch aus Zellen, die dem Mesoderm entstammen, den so genannten Mesenchymzellen (s. 6.4.1), hervor.

Pauwels (1960) beschrieb in seiner kausalen Histomorphogenese erstmals Dehnung und hydrostatischen Druck als Hauptfaktoren der spezifischen Gewebsdifferenzierung. Dehnung gilt dabei als spezifischer Reiz für die Bildung von kollagenen Fibrillen, verstärkter hydrostatischer Druck induziert eher die Entwicklung von Knorpelgewebe (Abb.4). Kummer (1980) definiert die Gleitsehne hingegen als eigene Entität, die einem im Vergleich zur Zugsehne verstärkten hydrostatischen Druck ausgesetzt ist.

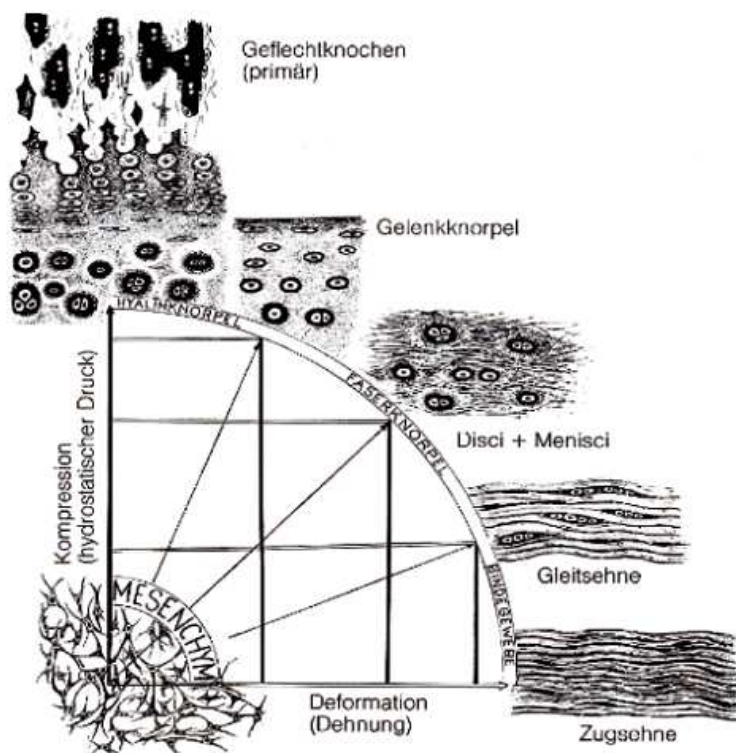


Abb. 4: Schema der kausalen Histomorphogenese nach Pauwels (modifiziert nach Kummer). Übernommen aus <http://www.bisp.de/archiv/download/alt.pdf>

#### 6.4.1. Mesenchymale Vorläuferzellen

Mesenchymale Vorläuferzellen (MSC) sind pluripotente Zellen, die sich primär im Knochenmark finden. Daneben konnten sie bisher sowohl im Periost, muskulären Bindegewebe, fetalen Knochenmark sowie in der Leber und dem Blut nachgewiesen werden (Nathanson 1985, Nakahara et al. 1991, Campagnoli et al. 2001, Fibbe 2002). Sie besitzen das Potential, sich sowohl in Osteo-, Chondro-, Fibro- als auch Myeloblasten zu differenzieren. Zellkulturstudien haben gezeigt, dass es zwischen den verschiedenen Zellarten durch das Einwirken spezifischer Reize zur Metaplasie kommen kann. Als Beispiel hierfür sei die Entwicklung von Fibroblasten zu chondrozytären Zellen und umgekehrt angeführt (Benya et al. 1978).

MSCs werden durch das gleichzeitige Vorhandensein verschiedener Epitope identifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurden dabei die Gewebeproben auf folgende in der Literatur etablierte Marker hin untersucht: SH2, SH3, SH4, Thy1 (CD90) sowie CD166 (ALCAM) (Fibbe 2002, Arai et al. 2002, Fickert et al. 2003, Fickert et al. 2004).

Der SH2-Antikörper markiert ein Epitop von Endoglin (CD105), einem TGF  $\beta$ -bindenden Transmembranprotein, auf das unter 6.7.1 im Rahmen seiner Funktion auf Endothelzellen näher eingegangen werden soll. Mehrere Studien konnten für CD105 ein regelmäßiges Vorkommen auf MSCs nachweisen (Barry et al. 1999, Bayes-Genis et al. 2005, Teplashin et al. 2005, Mansilla et al. 2006).

SH3- und SH4- Antikörper binden an unterschiedliche Epitope, die auf CD73 zu finden sind. CD73 wird im lymphatischen Gewebe expremiert. Neben seiner Funktion in der Aktivierung von B-Lymphozyten agiert CD73 in der Signaltransduktion im hämatopoetischen Stammzellgewebe. Welche Rolle es bei den mesenchymalen Vorläuferzellen spielt, wird zur Zeit noch diskutiert (Barry et al. 2001).

Thy1 (CD90) gehört zu den Epitopen mit regelmäßigen Vorkommen auf mesenchymalen Vorläuferzellen (Fibbe 2002, Fickert et al. 2003, Fickert et al. 2004, Mansilla et al. 2006).

Daneben findet sich CD90 auf T-Lymphozyten, Thymozyten, neuronalen Zellen, Kupferzellen und Fibroblasten. Im Gehirn wird ihm eine Rolle in der Zell-Zell- und Zell-Liganden – Interaktion während der Synaptogenese zugeschrieben (Cheung und Briscoe 2003, Stolt et al. 2003).

CD166 (ALCAM) ist ein 105 kD Transmembranprotein und wurde erstmals auf epithelialen Thymuszellen und aktivierten Leukozyten beschrieben (Bowen et al. 1995, Patel et al. 1995). Weitere Studien konnten CD166 auch beim metastasierenden Melanom, auf Endothelzellen, Hämatopoese-unterstützenden Osteoblasten, neuronalen Zellen sowie fetalen Bindegewebs-

zellen (z.B. paraaortales Mesoderm, Leber, Knochenmark) nachweisen (Degen et al. 1998, Nelissen et al. 2000).

Des Weiteren wird in der Literatur das regelmäßige Auftreten von CD166 auf mesenchymalen Vorläuferzellen beschrieben. Dabei wird ihm eine Rolle in der osteoblastären Metaplasie unterstellt, da eine Rückbildung der CD166-Expression mit dem gleichzeitigen Auftreten von alkalischer Phosphatase einhergeht. Diese Tatsache wird zur Zeit aber noch in der Literatur diskutiert (Bruder et al. 1998, Arai et al. 2002). Exemplarisch für alle oben aufgeführten Marker von mesenchymalen Vorläuferzellen zeigt Abbildung 5 die Differentierungsmöglichkeiten der CD166-positiven perichondralen Zellen.

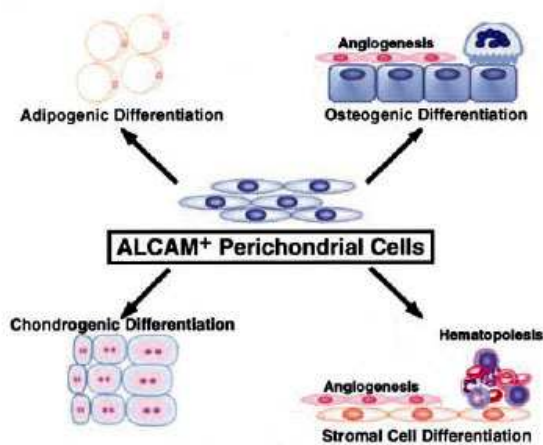


Abb. 5: Modifiziert nach Arai (2002)

## 6.5. Extrazelluläre Matrix (EZM)

Die extrazelluläre Matrix bestimmt durch ihre Bestandteile die Struktur und somit die mechanische Stabilität sowie die biochemischen Eigenschaften von Geweben. Sie wird zum Großteil durch die Bindegewebszellen, zu denen im weiteren Sinne neben den Fibroblasten bzw. Fibrozyten auch die Tenoblasten, Osteoblasten und Chondroblasten gezählt werden, produziert. Diese Zellen sezernieren Proteine, die in vier verschiedene Gruppen eingeteilt werden: Kollagene, Elastin, Proteoglykane, nichtkollagene Glykoproteine (Deutzmann et al. 2003). Im Folgenden sollen kurz die für die vorliegende Arbeit relevanten Bestandteile der EZM näher erläutert werden.

### 6.5.1. Die Kollagene

Die Kollagene bilden quantitativ die größte Gruppe von Proteinen im Körper. Bis jetzt sind mehr als 26 verschiedenen Kollagen-Typen charakterisiert worden, wobei davon ausgegangen wird, dass dies noch nicht vollständig ist. Ihnen gemeinsam sind stabförmige Abschnitte, die eine tripelhelikale Konformation besitzen und aus drei Polypeptidketten, so genannten  $\alpha$ -Ketten, bestehen, die sich durch die repetitive Aneinanderreihungen der Tripel-Sequenz Gly-X-Y auszeichnen. X und Y sind häufig Prolin und Hydroxyprolin, wobei Hydroxyprolin via Wasserstoffbrücken dafür sorgt, dass der Schmelzpunkt der Kollagene auf über 40°C heraufgesetzt wird, was eine Voraussetzung für die Ausbildung der Tripelhelix bei 37°C Körpertemperatur darstellt. Die spezifischen Eigenschaften der einzelnen Kollagen-Typen entstehen durch die unterschiedlichen Längen der tripelhelikalen Abschnitte, kurzen Unterbrechungen in der Tripelhelix sowie dem Auftreten von globulären Domänen. Es werden fibrilläre (Kollagen Typ I, II, III, V, XI) von fibrillen-assoziierten (Kollagen Typ IX, XII, XIV, XVI, XIX) und nicht-fibrilläre Kollagene unterschieden, wobei die nicht-fibrillären Kollagen noch einmal in verankerungsfibrillenbildende (Kollagen Typ VII) bzw. netzwerkbildende Kollagene (Kollagen Typ IV, VI, VIII, X) sowie Kollagene mit Transmembrandomänen (Kollagen Typ XIII, XVIII) unterschieden werden. Einige Kollagen-Typen (z.B. Kollagen Typ XV, XVIII und XIX) lassen sich diesem Schema noch nicht zuordnen. Bei entsprechenden mechanischen Anforderungen können sich einzelne fibrilläre Kollagene zu Mischfibrillen zusammenlagern, um so ihren Gesamtdurchmesser zu vergrößern. Daneben spielen die so genannten fibrillen-assoziierten Kollagene eine wichtige Rolle bei der funktionellen Anpassung der Kollagene. Sie lagern sich an andere Kollagene an und sorgen so dafür, dass sich entweder keine weiteren fibrillären Kollagene anlagern können, um den Fibrillendurchmesser noch mehr zu vergrößern, oder verändern durch Seitenketten chemische Eigenschaften, wie z.B. die Hydrophilie. Als ein Beispiel hierfür sei die häufig auftretende Anlagerung von Kollagen Typ IX an Kollagen Typ II erwähnt, was zu einer erhöhten Hydrophilie führt, die den Gelenkknorpel vor mechanischer Abnutzung schützt (Stevens und Lowe 1997, Deutzmann et al. 2003, Gelse et al. 2003).

Es folgt eine kurze Übersicht der in der vorliegenden Arbeit näher untersuchten Kollagen Typen.

#### 6.5.1.1. Kollagen Typ I

Kollagen Typ I gehört zu den fibrillären Kollagenen und bildet 90% der Grundmasse des Knochens. Des Weiteren ist es Hauptbestandteil von Sehnen, der Haut, Ligamenten und der Kornea. Bis auf wenige Ausnahmen, wie z.B. im hyalinen Knorpel und dem Glaskörper, stellt es den Großteil des interstitiellen Gewebes dar. Es ist aus zwei  $\alpha 1(I)$ - und einer  $\alpha 2(I)$ -Kette aufgebaut und verleiht der Sehne ein hohes Potential an Steifheit und Zugfestigkeit (Stevens und Lowe 1997, Gelse et al. 2003). Ein Defekt im Kollagen Typ I-Gen führt zu der Erkrankung Osteogenesis imperfecta, die sich durch zugschwache Sehnen, einer dünnen Haut und je nach Subtyp der Erkrankung verschiedensten Knochendefekten auszeichnet (Deutzmann et al. 2003).

#### 6.5.1.2. Kollagen Typ II

Das fibrillenbildende Kollagen Typ II ist der Hauptbestandteil des hyalinen Knorpels. Es besteht aus drei  $\alpha 1(II)$ -Ketten und findet sich im Knorpel häufig mit den fibrillen-assoziierten Kollagenen vom Typ IX und XI, die den Mischfibrillendurchmesser auf 15-50 nm begrenzen. Neben dem hyalinen Knorpel präsentiert sich Kollagen Typ II auch in den Bandscheiben sowie dem Glaskörper des Auges. Im Vergleich zu Kollagen Typ I enthält Kollagen Typ II mehr Hydroxyprolin sowie Glukose- und Galaktosereste. Dies begünstigt die Interaktionen mit Proteoglykanen, wie z.B. mit dem knorpeltypischen Aggrekan (s. unten) (Stevens und Lowe 1997, Gelse et al. 2003).

#### 6.5.1.3. Kollagen Typ III

Kollagen Typ III gehört zu den fibrillären Kollagenen und besteht aus drei gleichen  $\alpha 1(III)$ -Ketten. Es findet sich vor allem in dehnbaren Geweben bzw. im interstitiellen Gewebe von Lunge, Leber, Haut, Milz und von Gefäßen. Daneben spielt es eine wichtige Rolle während der Heilungsphase von Gewebsdefekten (Liu et al. 1995). Im Vergleich zu Kollagen Typ I zeichnet sich Kollagen Typ III durch einen geringeren Fibrillendurchmesser und eine erhöhte Dehnbarkeit aus.

#### 6.5.1.4. Kollagen Typ VI

Kollagen Typ VI besteht aus drei verschiedenen  $\alpha$ -Ketten ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ) und gehört zu den nicht-fibrillären Kollagenen. Es ist ubiquitär aufzufinden und zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Disulfidbrücken aus, die der Interaktion mit anderen Kollagenen dienen (Deutzmann et al. 2003, Gelse et al. 2003). Im hyalinen Knorpel macht Kollagen Typ VI zwar lediglich 1% aller Kollagene aus, zeichnet sich aber dadurch aus, dass es sich typischerweise fast ausschließlich in der näheren Umgebung der Chondrone findet. Diese Tatsache legt nahe, dass Kollagen Typ VI eine gewissen Funktion in der Organisation und Vernetzung der perizellulären Matrix zukommt (Keene et al. 1988, Winter et al. 1998).

#### 6.5.2. Das Proteoglykan Aggrekan

Wie oben bereits erwähnt, gehören Proteoglykane zu den vier großen Gruppen, aus denen die extrazelluläre Matrix aufgebaut ist. Weiterhin sind sie auch Zelloberflächenproteine. Sie werden anhand der kovalent mit dem Proteingerüst verknüpften Glykosaminoglykan-Seitenketten definiert. Diese Seitenketten sind große, unverzweigte aus repetitiven Disaccharideinheiten bestehende Polysaccharidketten, die anhand ihrer Grundbausteine in Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Dermatansulfat und Heparansulfat und Hyaluronsäure unterteilt werden. Der Hyaluronsäure kommt eine Sonderstellung zu, da diese als einzige keine kovalente Bindung eingeht (Stevens und Lowe 1997, Deutzmann et al. 2003).

Aggrekan stellt das Hauptproteoglykan des Knorpels dar. Durch ca. 30 Keratansulfat- und ungefähr 100 Chondroitinsulfat-Seitenketten erhält es eine hohe Konzentration an Ladungen, die es ihm ermöglichen ein hydratisiertes, hyperosmotisches, reversibel deformierbares Gel zu bilden. Im Knorpel bildet es riesige Aggregate mit Hyaluronsäure, die durch ein kleines Protein, das so genannte Link-Protein, stabilisiert werden. Tierexperimentell erzeugte Mutationen, die zu einem nichtfunktionierenden Aggrekan-Protein führen, enden für den Organismus durch eine reduzierte Knorpelbildung letal (Deutzmann et al. 2003).

## 6.6. Der Transkriptionsfaktor Sox9

Sox9 gehört zur Familie der Sox-Transkriptionsfaktoren. Diese Transkriptionsfaktoren enthalten eine DNA-Bindungsstelle, die in mehr als 50% mit der sex-determining-region-Y (kurz: Sry) identisch ist und zur Gruppe der High Mobility Groups (kurz: HMG) gehört. Die DNA-Bindungsstelle wird daher auch vereinfacht Sry-box genannt, so dass sich daraus auch das Akronym Sox erklärt: Sry-related High Mobility Group Box (Lefebvre et al. 1997, Wegner 1999). Die Proteine der HMG-Familie sind eine Nicht-Histon-Komponente des Chromatins, die eine wichtige Rolle bei der Derepression des Chromatins und beim Aufbau der Transkriptionsmaschinerie spielen (Huth et al. 1997, Wisniewski und Schwanbeck 2000).

Sox9 konnte als Transkriptionsfaktor in mehreren entwicklungsbiologischen Prozessen nachgewiesen werden. Im Folgenden seien kurz die aktuell in der Literatur am häufigsten beschriebenen Funktionen aufgelistet:

Sox9 ist an der Geschlechtsentwicklung insbesondere während der Sertoli-Zell- und Hodenentwicklung beteiligt (Morais da Silva et al. 1996, Malki et al. 2005). Zum Zeitpunkt der sexuellen Differenzierung wird Sox9 in den Zellkern der Sertoli-Vorläuferzellen transportiert und dort bis ins Erwachsenenalter expremiert, während es in weiblichen Zellen im Zytoplasma verweilt und seine Expression einstellt (Gasca et al. 2002, Argentaro et al. 2003, Malki et al. 2005).

Die Sox9-Expression ist ein wesentlicher Bestandteil der Skelettentwicklung. Der Transkriptionsfaktor lässt sich während der Embryogenese in nahezu allen Strukturen, die am Aufbau des Skelettes beteiligt sind, nachweisen, u.a. im Kopfmesenchym, im lateralen Plattenmesoderm, in den Sklerotomen der Somiten sowie in auswandernden Neuralleistenzellen (Wright et al. 1995, Ng et al. 1997, Zhao et al. 1997). Seine bisher wichtigste Funktion scheint Sox9 dabei während der Chondrogenese zu spielen. Besonders hohe Konzentrationen lassen sich hier in mesenchymalen Vorläuferzellen bei der Entwicklung ihres chondrogenen Phänotyps nachweisen, was der Abgrenzung von anderen Zelllinien, wie z.B. Tenozyten, dient (Asou et al. 2002). Der Transkriptionsfaktor sorgt hierbei für eine zellspezifische Aktivierung von Col2A1, indem es an ein Enhancer-Element im Intron 1 des Kollagen Typ II Gens bindet (Lefebvre et al. 1997, Lefebvre et al. 2001). Des Weiteren konnte eine Beteiligung von Sox9 an der Expression von Aggrekan nachgewiesen werden (Sekiya et al. 2000). Sekiya et al. (2000) haben durch *in vitro*-Studien gezeigt, dass Sox9 an ein Enhancer-Element im Intron 1 des Aggrekans Genes bindet.

Während der Entwicklung des ZNS spielt Sox9 eine tragende Rolle bei der Differenzierung von neuronalen Stammzellen in Gliazellen (Stolt et al. 2003, Wegner und Stolt 2005).

Für Hühner konnte eine Beteiligung von Sox9 an der embryonalen Entwicklung der hinteren Anteile des Magens ermittelt werden (Theodosiou und Tabin 2005).

Sox9 wurde während des Entwicklungsprozesses des Melanozytenphänotypes nachgewiesen (Cook et al. 2005). Hier wurde v.a. in Melanoblasten eine erhöhte Konzentration des Transkriptionsfaktors beobachtet, der anscheinend maßgeblich am Übergang des Melanoblasten zum Melanozyten beteiligt ist.

Bei der embryonalen Entwicklung des Herzens fand sich Sox9 diffus im Herzen verteilt. V.a. in den epithelialen-mesenchymalen Anteilen, wie der Klappen- und Septenregion, ließ sich eine Koexpression von Sox9 und Kollagen Typ II nachweisen, so dass von einer Beteiligung des knorpeltypischen Kollagens an der Herzklappen- und Septenregion ausgegangen werden muss (Rahkonen et al. 2003).

Jay et al. (2005) wiesen nach, dass Sox9 in Kolon-Karzinom-Zellen zu einer Inhibition des Carcinoembryonic-Antigens (CEA) führt. Da eine CEA-Überexpression, wie sie in Karzinomen vorliegt, die Zellen vor Apoptose schützt, ist Sox9 durch Inhibition des CEA eine tumorzellreduzierende Wirkung zuzuschreiben.

Ein Großteil der oben erwähnten Funktionen spiegeln sich in einem Fehlbildungssyndrom namens Kampomelie (gr. κάμπτειν beugen, krümmen; -melie gr. μέλος Wortteil mit der Bedeutung –gliedrigkeit) wieder, bei der ein Defekt im Sox9-Gen nachgewiesen werden konnte (Kwok et al. 1995, Mansour et al. 1995). Bei diesem Syndrom kommt es zu multiplen Fehlbildungen in Strukturen, die im Rahmen der enchondralen Ossifikation aus Knorpelvorstufen entstehen. Dies sind sowohl diverse Skelettfehlbildungen als auch Fehlbildungen der knorpeligen Anteile des Respirationstraktes, so dass viele Kinder kurz nach der Geburt an respiratorischer Insuffizienz sterben. Zusätzlich kann es zu multiplen Fehlbildungen der inneren Organe kommen. Bei drei Viertel aller männlichen Patienten tritt ein Sistieren der männlichen Geschlechtsentwicklung auf, so dass diese einen weiblichen Phänotyp entwickeln. (Mansour et al. 1995, Pschyrembel 1998)



## 6.7. Gefäßneubildung der Sehne: VEGF & Endostatin

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gefäße mit Antikörpern gegen CD31 und die schwere Myosinkette dargestellt. CD31 ist ein Transmembranprotein, das auf Gefäßendothelien expremiert wird. Daneben präsentiert es sich auch diffus auf den Oberflächen von natürlichen Killerzellen, Vorläufern von B-Zellen, Thrombozyten, Megakaryozyten und Myeloidzellen. Seine Funktion besteht in der Interaktion zwischen benachbarten Endothelzellen und Leukozyten mit Endothelzellen (Pusztaszeri et al. 2006, Tete et al. 2006). Die schwere Myosinkette findet sich im Zytoplasma von glatten Muskelzellen. Glatte Muskelzellen sind ein wichtiger Bestandteil von Gefäßen, dem Magendarmtrakt, dem Urogenitalsystem sowie dem respiratorischen System (Aikawa et al. 1993, Owens 1998, Wamhoff et al. 2006).

Die Gefäßneubildung resultiert aus dem Verhältnis zwischen vaskularisationsfördernden und vaskularisationshemmenden Faktoren. Neben diversen anderen Wachstumsfaktoren, wie u.a. TGF  $\beta$  (s. 6.7.1), Thrombospondin und Angiostatin sind Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Endostatin als besonders wichtige Gegenspieler zu nennen (Folkman und Klagsbrun 1987, Ono und Kuwano 1997, Neufeld et al. 1999, Pufe et al. 2005).

Durch alternatives Splicing der VEGF-mRNA entstehen fünf verschiedenen Isoformen, VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub>. Diese fünf Isoformen unterscheiden sich anhand ihres Molekulargewichtes sowie der Fähigkeit, sich an das an der Zelloberfläche lokalisierte Proteoglykan Heparansulfat bzw. verschiedenen VEGF-Rezeptoren zu binden. VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub> und VEGF<sub>165</sub> werden sezerniert, während VEGF<sub>189</sub> fest an das Zelloberflächenproteoglykan Heparansulfat gebunden ist und VEGF<sub>206</sub> einen festen Bestandteil der Zellmembran bildet. Es werden drei verschiedene VEGF-Rezeptoren (VEGFR) unterschieden. VEGFR-1 und VEGFR-2 gehören zur Familie der Thyrosinkinaserzeptoren und werden vor allem auf Endothelzellen expremiert. VEGFR-3 findet sich auf Lymphgefäßen. Hypoxie und Hypoglykämie bilden die Haupttriggerfaktoren der VEGF-Expression. Daneben konnte für den Knorpel erhöhter hydrostatischer Druck als weiterer Induktor der VEGF-Expression nachgewiesen werden (Pufe et al. 2004).

VEGF fördert sowohl die Zellproliferation als auch die Zellmigration. Es induziert die Angiogenese und erhöht gleichzeitig die Permeabilität der Gefäße. VEGF übernimmt bereits frühzeitig in der Embryonalperiode eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Gefäßsystems, so dass sowohl zu niedrige als auch zu hohe Konzentrationen von VEGF zu fatalen Missbildun-

gen führen können. VEGF scheint auch eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Gefäßneubildungen bei Tumoren zu spielen (Neufeld et al. 1999, Pufe et al. 2003a).

Der Anti-Angiogenesefaktor Endostatin besitzt ein Molekulargewicht von 20kD. Er inhibiert die Endothelzellproliferation *in vitro* sowie das Tumorwachstum *in vivo* (O'Reilly et al. 1997, Sunassee und Vile 1997). Eine sequenzielle Analyse von Endostatin wies eine identische Sequenz mit dem C-terminalen Fragment der NC1 Domäne von Kollagen Typ XVIII auf (Pufe et al. 2003b).

Da der metabolische Bedarf in Sehnen nur sehr gering ist, findet sich in adulten Sehnen nur eine gering ausgeprägte Vaskularisation. Dies spiegelt sich in den Untersuchungen von Pufe et al. (2001) über die Achillessehne wieder, in denen in adulten Achillessehnen kein VEGF nachgewiesen werden konnte. Insbesondere in Gleitsehnen mit einer relativ avaskulären Zone im Bereich des Hypomochlions findet sich ein verstärktes Auftreten von Endostatin in den chondrozytären Zellen (Pufe et al. 2005). Hohe Konzentrationen an VEGF konnten Pufe et al. (2001) hingegen im ELISA von Achillessehnen nachweisen, die aufgrund einer chronischen Tendinosis rupturiert waren. Geringere Konzentrationen waren außerdem im ELISA von fetalen Achillessehnen zu beobachten. Auch immunhistologisch fand sich VEGF in den Tenozyten von rupturierten und fetalen Sehnen (Pufe et al. 2001). Das Phänomen der erhöhten VEGF-Konzentration kann auch bei anderen chronischen Prozessen, wie dem chronischen sakralen Dekubitus oder dem Karpaltunnelsyndrom, nachgewiesen werden (Hirata et al. 2004, Pufe et al. 2003a). Verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren werden hierfür verantwortlich gemacht. Neben der Funktion via Gefäßproliferation den Heilungsprozess zu unterstützen, wird für VEGF eine die Degeneration unterstützende Rolle diskutiert. Bei einer verstärkten Expression von VEGF, die über die normale Heilungsphase hinaus andauert, soll es durch die neugebildeten Gefäße zur übermäßigen Gewebsinvasion kommen, was die Gewebstruktur zusätzlich schwächt. So fanden sich nicht nur in der rupturierten Achillessehne erhöhte VEGF-Konzentrationen, sondern auch im osteoarthritisch veränderten Knorpel (Pufe et al. 2005, Enomoto et al. 2003).

#### 6.7.1. Endoglin (CD105) und die Angiogeneese

Endoglin ist ein 180 kD Typ I Transmembranprotein, das v.a. in humanen Endothelzellen expremiert wird. Daneben findet es sich auch auf der Oberfläche von Synzytiotrophoblastzel-

len, Bindegewebszellen und Makrophagen. Eine wichtige Markerfunktion nimmt es bei der Darstellung von mesenchymalen Vorläuferzellen ein, auf die bereits unter 6.4.1 näher eingegangen wurde (Kumar et al. 1996, Alsalameh et al. 2004).

CD105 bindet mit hoher Spezifität TGF  $\beta_1$  und TGF  $\beta_3$ . TGF  $\beta$  spielt, wie oben bereits erwähnt, eine wichtige Rolle in der Angiogenese. Dem 25kD dimeren TGF  $\beta$ -Molekül wird einerseits *in vitro* eine inhibitorische Funktion bei der Endothelzellproliferation und –migration zugeschrieben, andererseits konnte *in vivo* eine gefäßproliferationsinduzierende Wirkung von TGF  $\beta$  nachgewiesen werden (Roberts et al. 1986, Roberts und Sporn 1989, Roberts und Sporn 1993, Yang und Moses 1990, Kumar et al. 1996).

*In vivo* fand sich TGF  $\beta$  v.a. in Geweben, die eine ausgeprägte Angiogeneese aufwiesen, wie z. B. Tumorgewebe, embryonalem Gewebe, Wundheilungs- und Infarktgewebe, sowie von Psoriasis betroffenen Gewebe (Westphal et al. 1993, Wang et al. 1995, Kumar et al. 1996, Kumar et al. 1999, Wikstrom et al. 2002, Salvesen et al. 2003).

Im Rahmen der Suche nach Prognose bestimmenden Tumormarkern wurde sowohl beim Endometriumkarzinom als auch beim Prostatakarzinom festgestellt, dass Antikörper gegen Endoglin mit einer signifikant erhöhten Spezifität die tumorassoziierte Neovaskularisation markieren. Im Vergleich dazu stellen Antikörper gegen die „traditionellen“ Gefäßmarker (z. B. CD31 und der von Willebrand-Faktor) eher die im „gesunden“ Gewebe vorhandenen Gefäße dar. Sowohl für das Brust-, als auch Endometrium- und Prostatakarzinom konnte bereits eine Korrelation zwischen dem Gehalt an CD105-positiven Zellen und der Prognose nachgewiesen werden (Kumar et al. 1996, Kumar et al. 1999, Wikstrom et al. 2002, Salvesen et al. 2003).

## 6.8. Klassifikation und Therapie des Pes planovalgus

1989 haben Johnson und Strom eine klinische Einteilung der Knickplattfußdeformität erarbeitet (Johnson und Strom 1989). Die Klassifikation basiert auf der stadienabhängigen Fehlstellung des Rückfußes, des Mittelfußes sowie der Fähigkeit zum einbeinigen Zehenstand. Stadium 4 wurde von Myerson (1997) ergänzt und besteht aus allen Merkmalen des Stadiums 3 sowie zusätzlich einer valgischen Verkipfung des Talus. Tabelle 1 gibt kurz die wichtigsten Merkmale der verschiedenen Stadien wieder.

	<b>Stadium 1</b>	<b>Stadium 2</b>	<b>Stadium 3</b>	<b>Stadium 4</b>
<b>Zustand der Sehne</b>	Peritendinitis evtl.mit Erguss/ Degeneration	Elongation/ Degeneration	Elongation/ Degeneration	Elongation/ Degeneration
<b>Schmerzen</b>	Medialer Fuß- rand	Medialer Fuß- rand	Medialer Fuß- rand	Medialer Fuß- rand
<b>Rückfußfehlstellung</b>	Orthograd	Valgisch (fle- xibel)	Valgisch (kon- trakt)	Valgisch (kon- trakt)
<b>Mittelfußfehlstellung</b>	Orthograd	Orthograd/ abduziert	Abduziert	Abduziert
<b>Einbeiniger Zehen- stand</b>	Möglich	Abgeschwächt	Nicht möglich	Nicht möglich
<b>„Too many toes“ sign *</b>	Negativ	Positiv	positiv	positiv
<b>Therapie</b>	Konservativ	Operativ	Operativ	Operativ

Tabelle 1: Modifizierte klinische Klassifikation der Knickplattfußdeformität nach Johnson und Strom (1989)

\* Als das „Too many toes“ sign wird die Tatsache bezeichnet, dass der Untersucher bei Betrachtung des Patienten von hinten lateral mehrere Kleinzehen sieht. Dies entsteht durch die Abduktion des Mittelfußes.

Im Folgenden seien kurz die wichtigsten stadienadaptierten therapeutischen Maßnahmen aufgelistet:

- Die Therapie des Stadiums1 erfolgt in der Regel konservativ mit einer antiphlogistischen Therapie, vorübergehender Immobilisation, Einlagen oder Orthesen. Zusätzlich sollen spezielle krankengymnastische Konzepte die dynamischen Stabilisatoren des Fußgewölbes reaktivieren (Zwipp et al. 2000, Fuhrmann et al. 2005).
- Im Stadium 2 reicht meist eine konservative Therapie allein nicht mehr aus, da es nun zu den ersten Rückfußfehlstellungen kommt. Historisch gesehen standen in diesem Stadium zunächst reine Weichteileingriffe im Vordergrund. Jahss (1982) beschrieb erstmals die Seit-zu-Seit-Adaptation der Postikussehne mit der Sehne des M. flexor digitorum. Heutzutage wird zumeist die Augmentation mit der Flexor-digitorum-longus – bzw. Flexor-hallucis-longus-Sehne durchgeführt. Neben einer Aufrichtung des Längsgewölbes soll hierbei auch eine Reposition des Talonavikulargelenkes er-

reicht werden. Diese Verfahren sind aber bei Erwachsenen zumeist nur von temporärem Erfolg, so dass bereits im Stadium 2 Rückfußosteotomien durchgeführt werden. Die zwei gängigsten Verfahren sind dabei die Technik nach Koutsogiannis sowie die Evans-Osteotomie. Bei der Methode nach Koutsogianni wird mit der Osteotomie eine mediale Verschiebung des Tuber calcanei durchgeführt. Dies führt zu einer Verschiebung der Zugrichtung der Achillessehne nach medial und somit bei aktiver Kontraktion des M. triceps surae zu einer Reduktion der Valgusstellung des Rückfußes. Bei der Evans-Osteotomie wird eine vordere Kalkaneusosteotomie zur Verlängerung der lateralen Fußsäule durchgeführt. Gelegentlich sind zusätzlich Kontrakturen des M. gastrocnemius bzw. M. soleus aufzufinden, die durch eine Achillessehnenverlängerung oder Rezession der Faszie des M. gastrocnemius ausgeglichen werden sollten (Fuhrmann et al. 2005, Zwipp und Rammelt 2006).

- Im Stadium 3 steht die Korrektur der ossären Mittel- und Rückfußfehlstellungen durch Korrekturarthrodesen im Vordergrund. Reine Weichteileingriffe sind hier in keinem Fall mehr ausreichend. Auf Kosten der Gelenkbeweglichkeit lassen sich bezüglich der Pes planovalgus-Fehlstellung die besten Ergebnisse durch eine Arthrodesse des unteren Sprunggelenkes (sog. Triple-Arthrodesse des Subtalar-, des Talonavikular- und des Kalkaneokuboidalgelenkes) erreichen. Ob eine komplette Triple-Arthrodesse durchgeführt werden muss, hängt dabei von der Rückfußfehlstellung und begleitenden Gelenkveränderungen ab (Kitaoka und Patzer 1997, Kitaoka et al. 1997, Fuhrmann et al. 2005).
- Im Stadium 4 kann therapeutisch zusätzlich nur noch eine komplette Versteifung des oberen und unteren Sprunggelenkes durchgeführt werden. Hierbei sind allerdings Nutzen und funktionelle Einschränkung genau gegeneinander abzuwägen (Fuhrmann et al. 2005).

## 7. Materialien

### 7.1. Geräte

Autoklav Systec V-120	Systec GmbH Labortechnik, Wetztenberg
Begasungsbrutschrank INCO2	MEMMERT GmbH & Co. KG, Schwabach
Eismaschine Scotsman AF 80 WS	SCOTSMAN, Mailand, Italien
Gefriergeräte:	
Gefriertruhe (-80°C)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
GS 801 (-20°C)	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Gefriermikrotom Leica CM 1100	Leica, Nussloch
Gelkammer	BIO-RAD MINI-SUB® CELL GT, München
Histokinette	Shanon Citodel 1000, Frankfurt
Kühlplatte Leica EG 1130	Leica, Nussloch
Kühlschrank KT 1740	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Löffel/Spatel aus Edelstahl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Magnetrührer Variomag® Compact HP 1	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Magnetrührer Typ MR 1000	Fa. Heidolph, Kelheim
Magnetstabentferner	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
PCR (Polymerase-Chain-Reaction) Maschine	Master Cycler Gradient, Eppendorf
Microtom Typ HM 355	Microm Typ, Walldorf
Mikroskope:	
Axiovert 25	Zeiss, Jena
Axiovert 200M	Zeiss, Jena
Mikrowelle KOG-5747	Daewoo, Butzbad
Mittelringmagnetstäbchen, versch. Größen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Netzgerät für Gelkammer BIO-RAD POW- ER PAC 30C	BIO-RAD, München
Paraffinbehälter mit Wärmeplatte Leica EG 1120	Leica, München
pH-Meter HI 8014	HANNA Instruments, Kehl am Rhein
Pipetten:	
Research® 2.5, 10, 100, 1000, 5000µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Reference® 10, 100, 200, 1000µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Handdispenser HandyStep®	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Reinstwassersystem TKA-LAB Typ HP 6	TKA, Niederelbert
Thermostat plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
UV – Illuminator BIO-RAD Fluor-S™ Multi- tanager	BIO-RAD, München
Wasser-Filtrieranlage	TKA-LAB Reinstwassersystem Typ HP 6UV/VF
Waage:	
Sartorius BP 1219	Sartorius, Göttingen
Sartorius KERN GS	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge	Eppendorf mini Spin

## 7.2. Chemikalien

Agarose	BIO-RAD certified™ Molecular Biology Agarose Cat#161-3102, München
DNA-Marker	Carl Roth GmbH pUC19/MSP I Art.Nr. T149.1, Karlsruhe
EDTA	
Essigsäure	Merck Z594862103, Darmstadt
Ethanol	Apotheke KIM, Jena
Ethidiumbromid (Ethbr.)	Carl Roth GmbH Art. Nr. 7870.1 10 mg/ml, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol GR for analysis	Merck, Darmstadt
Bio-Magermilchpulver 1%	Lasana
Orange G	Sigma-Aldrich, Lot# 122K3748, München
Paraformaldehyd	Merck K28306405040, Darmstadt
Tris-hydroxymethyl-aminomethan	Merck K28265482042, Darmstadt
Xylol	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

## 7.3. Enzyme

Albumin Fraktion V	Merck Lot# K 28335418044, Darmstadt
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich Lot# 39K7049, München

RNase Out

Merck Lot# 1252277, Darmstadt

## 7.4. Färbungen

Alcianblau

Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

Eosin

Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)

Sigma-Aldrich, Nr. D9542, München

Hämatoxylin nach Gill

Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

Kernechtrot

Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

Lichtgrün

Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

Pikrofuchsin-Lösung

Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

Ponceau Säurefuchsin-Lösung

Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

Safranin O 1%

Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

2E 032 Eisen-Haematoxylin **A**

Waldeck GmbH & Co. KG, Division

2E 052 Eisen-Haematoxylin **B**

Chroma<sup>®</sup>, Münster

## 7.5. Antikörper

### 7.5.1. Erstantikörper

AggreCan

Acris Antibodies GmbH, Catalog No SM

1353, monoclonal mouse anti-human,

2 ml/n.d., clone HAG7D4, Hiddenhausen

CD31

DakoCytomation, Code M0823, monoclonal

mouse anti-human, clone JC70A, Glostrup,

Dänemark

CD73

BD Biosciences, Catalog No 550256, mono-

clonal mouse anti-human, clone AD2, Hei-

delberg

CD 90/ Thy 1

abcam, Code ab11153, monoclonal-mouse

anti-human, 1 mg/ml, clone F15-42-1, Cam-

bridge, England



CD105 / Endoglin	DakoCytomation, Lot# M3527, monoclonal mouse anti-human, clone SN6h (Synonym GP160), Glostrup, Dänemark
CD166	CHEMICON <sup>®</sup> INTERNATIONAL, Cat No CBL3A6, monoclonal mouse anti-human, clone 306, Hampshire, England
Ki67	DakoCytomation, Code M7187, monoclonal mouse anti-human, clone Ki-S5, Glostrup, Dänemark
Kol1	Oncogene, Catalog No CP17L, monoclonal mouse anti-human, anti-rabbit, clone II-4C11, Cambridge, England
Kol2	CALBIOCHEM <sup>®</sup> , Lot# B49794, polyclonal mouse anti-human & anti-mouse & anti-rat, Darmstadt
Kol2	Oncogene, Catalog No CP18L, monoclonal mouse anti-human, clone II-4C11, Cambridge, England
Kol3	CALBIOCHEM <sup>®</sup> , Lot# D24819, polyclonal rabbit anti-human & anti-mouse & anti-rat & anti-marmoset, Darmstadt
Kol6	abcam, Code ab6588, polyclonal rabbit anti-human & anti-bovine, 1 mg/ml, Cambridge, England
Myosin, Smooth Muscle Heavy Chain	CALBIOCHEM <sup>®</sup> , Lot# D20192, monoclonal mouse anti-human, 200 µg/ml, clone SMMS-1, Darmstadt
Sox9	CHEMICON <sup>®</sup> INTERNATIONAL, Lot# 25060072, polyclonal rabbit anti-human, 0,48 mg/ml, Hampshire, England
Anti-Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	Kamiya Biomedical Company, Seattle, Cat. No. MC 420, polyclonal anti-human & anti-rabbit, clone JH 121, Seattle, USA

### 7.5.2. Zweitantikörper (fluoreszierend)

Fluoreszein goat anti-mouse IgG	MoBiTec, Cat. No. F-2761, Göttingen
Rhodamine Red-X-goat anti-mouse IgG	MoBiTec, Cat. No. F-6393, Göttingen
Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit	MoBiTec, Cat. No. A-11012, Göttingen
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit	MoBiTec, Cat. No. A-11008, Göttingen

### 7.6. Test-Kits

Antifade Kit	Antifade Kit, MoBiTec (P-7481), Göttingen
Hot Start Master Mix	Quiagen Cat#201443, Hilden
Omniscript® RT Kit	Quiagen Cat#205111, Hilden
RNA-Isolation	MACHEREY-NAGEL Nucleo Spin® RNAII; Lot#408/003, Düren

### 7.7. Verbrauchsmaterialien

Objektträger	Superfrost Plus, Menzel beschichtet, Braunschweig
Paraffin	Paraplast Plus, Merck, Darmstadt
Tissue-Tek® O.C.T. compound™	Sakura Finetek GmbH, Heppenheim

### 7.8. Computersoftware

Acrobat 7.0 Professional	Adobe (Deutschland, München)
AxioVision 4.4	Carl Zeiss, Jena
AxioVision Viewer V 02-2000	Carl Zeiss, Jena
Adobe Photo Shop 5.0 und 7.0	Adobe Systems, München
Literaturverwaltung	EndNote6, Thomson ISI ResearchSoft, Philadelphia
Quantifizierungsprogramm für Gele	Quantify One® ,BioRad, München

## 8. Methoden

### 8.1. Entnahme der Präparate

#### 8.1.1. „Gesunde“ Vergleichsgruppe

Als Vergleichsgruppe wurden neun Postikussehnen von Patienten im Alter von 59 bis 83 Jahren entnommen, denen entweder auf Grund einer diabetischen Neuroosteoarthropathie, einer arteriellen Verschlusskrankheit oder eines Tumorleidens der Unterschenkel amputiert werden musste. Das Einverständnis der Patienten zur Weiterverwendung der Amputate lag vor. Die Sehnen zeigten makroskopisch alle kein Anzeichen für degenerative Veränderungen.

Zur Probenentnahme unter sterilen Bedingungen wurde ein gebogener Hautschnitt ca. 4 cm oberhalb des Malleolus medialis beginnend bis zum medialen Fußrand durchgeführt. Die Faszie wurde in gleicher Richtung eingekerbt, bevor das Retinaculum flexorum ventral eröffnet und die Tibialis-posterior-Sehne über ihre gesamte Länge bis zur Insertion am Os naviculare dargestellt werden konnte. Nach dem Freipräparieren der Sehne wurde diese abschnittsweise anhand vorher festgelegter Regionen (I-III) entnommen:

Region I: Sehnenabschnitt vom Muskel-Sehnenübergang bis zum Malleolus medialis

Region II: Sehnenabschnitt um den Innenknöchel (Regio malleolaris medialis)

Region III: Sehnenabschnitt distal des Innenknöchels bis zum knöchernen Sehnenansatz

(Abb. 6).

Die abgetrennten Teilstücke der Sehne wurden dann jeweils in ein ca. 1 cm langes Stück, das sofort in Längsrichtung in Tissue Tec für die immunhistologischen Untersuchungen sowie in ein ca. 5 mm langes Stück, das im Querschnitt eingebettet wurde, geteilt. Je nach Länge der Präparate wurde der Rest sofort in -80°C für die spätere RNA-Isolation tief gefroren.

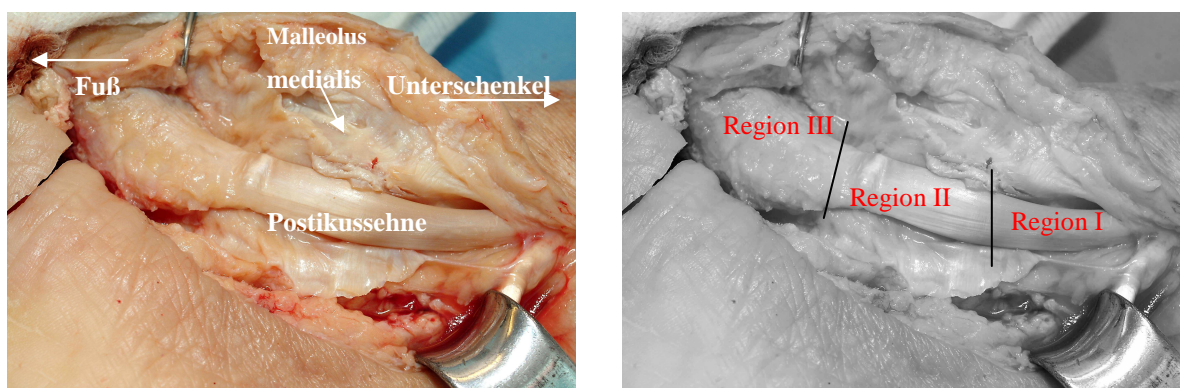


Abb. 6: Ansicht der freipräparierten Tibialis-posterior-Sehne

### 8.1.2. Sehne bei Tibialis-posterior-Dysfunktion und Pes plano-valgus (Operationspräparate)

Die zehn insuffizienten Sehnen wurden von Patienten entnommen, die auf Grund ihres Knickplattfußes bei Dysfunktion der Tibialis-posterior-Sehne operiert wurden. Die Gruppe bestand aus neun weiblichen und einem männlichen Patienten, die zwischen 21 und 73 Jahren alt waren. Gemeinsam war ihnen ein Schmerz im Innenknöchelbereich, sowie ein Druckschmerz im Verlauf der Postikussehne, eine valgische Rückfußfehlstellung, eine unterschiedlich stark ausgebildete Abflachung der Längswölbung und Abduktion des Mittelfußes, sowie ein abgeschwächter bis nicht mehr möglicher Einbein-Zehenstand. Damit lagen zum Zeitpunkt der Operation bei allen Patienten ein Knickplattfuß im Stadium 2 oder 3 nach Johnson und Strom vor (1989). Bei der Operation wurde die Tibialis-posterior-Sehne befundadaptiert debridiert, so dass ein unterschiedlich großes Präparat gewonnen werden konnte. Die Entnahmezone dieser Probe lag am Übergang der Region II zur Region III, da hier, wie auch in der Literatur bekannt, am häufigsten degenerative Veränderungen beobachtet wurden (Frey et al. 1990, Trnka 2004).

Nach einem bogenförmig geschwungenen Hautschnitt, beginnend retromalleolär am Innenknöchel nach distal plantar bis in Höhe des Os cuneiforme mediale auslaufend, wurde eine subtile Präparation der Subkutis bis auf das Retinaculum flexorum durchgeführt. Dieses wurde ventral über dem Fach der Tibialis-posterior-Sehne eröffnet, mit einer Präparierklemme unterfahren und längs gespalten. An dieser Stelle entleerte sich häufig ein Erguss, und es fand sich in fast allen Fällen eine Synovialitis, die zunächst entfernt wurde. Daraufhin wurde die

Sehne komplett dargestellt (Abb. 7). Je nach individuellen Gegebenheiten schlossen sich dann das Debridement der Sehne sowie befundadaptiert unterschiedliche Operationsverfahren an. Makroskopisch fanden sich unterschiedliche Stadien der Sehnendegeneration; die Befunde reichten von nahezu unauffälligen Sehnen, über aufgetriebene oder sanduhrförmig ausgedünnte bis hin zur komplett zerrissenen Sehnen.



Abb. 7: Blick auf die freipräparierte deutlich aufgetriebene Tibialis-posterior-Sehne zu Beginn der Operation.

## 8.2. Herstellung von Puffern und Lösungen

Für die Herstellung von phosphatgepufferter Saline (PBS) wurden 137,0 mM NaCl, 10,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,7 mM KCl und 2,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in destilliertem Wasser (a. d.) gelöst. Die Einstellung auf den pH-Wert von 7,4 erfolgte mittels pH-Meter durch die Zugabe von HCl. Die trisgepufferte Saline (TBS) setzte sich aus 50,0 mM Tris und 150,0 mM NaCl, gelöst in a. d. und eingestelltem pH-Wert 7,5, zusammen.

Die Zubereitung des verwendeten Tris-Bor-EDTA (TBE)-Puffers erfolgte durch das Auflösen von 50,0 mM Tris, 1,0 mM EDTA und 50,0 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$  in a. d. Dieser Elektrophorese-Puffer wurde vor Gebrauch mit 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  EthBr versetzt.

Die Lagerung aller oben aufgeführten Puffer erfolgte bei Raumtemperatur.

## **8.3 Histologie**

### **8.3.1 Herstellung von Gewebeschnitte**

Die ersten vier Sehnen der gesunden Vergleichsgruppe sowie die ersten zwei OP-Proben wurden, wie oben beschrieben, entnommen und zur Hälfte in Tissue Tec, zur anderen Hälfte in Paraffin eingebettet. Da sich die in Paraffin eingebetteten Sehnenstücke aber nur äußerst schwer schneiden ließen und die Kryohistologie sich durch eine bedeutend einfachere Vorbehandlung für die Immunhistologie auszeichnete, wurde im weiteren Verlauf einzig diese Methode der Gewebseinbettung genutzt.

Hierzu wurden die Sehnenstücke direkt nach der Probenentnahme in Tissue Tec eingebettet. Tissue Tec ist eine Lösung aus wasserlöslichen Glykolen und Harzen, die als Umgebungsmatrix zum Schneiden dient und während des Färbens keine Rückstände auf dem Objektträger lässt. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zum Färbeprozess bei -80°C. Mit dem Kryostat wurden bei -30°C 6 µm dicke Schnitte hergestellt, die anschließend über Nacht bei Raumtemperatur am Objektträger antrockneten.

### **8.3.2 Vorbehandlung der Gewebeschnitte**

Für die Hämatoxylin und Eosin (H&E)-Färbung, die Safranin O- Färbung sowie die Elastica van Gieson-Färbung als auch für einen Teil der immunhistologischen Färbungen wurden die Kryostatschnitte nur kurz mit TBS zur besseren Flüssigkeitsaufnahme angefeuchtet. Lediglich bei den Kollagen Typ II-, Kollagen Typ III- und Kollagen Typ VI-Färbungen sowie den CD90-, CD105- und CD166- Färbungen wurde eine 30 minütige Vorbehandlung mit Hyaluronidase (1 µg/ml PBS) bei 37°C durchgeführt. Die Spaltung von Hyaluronsäure, das in allen Bindegeweben und Stützgeweben vorkommt, lockert dieses Gewebe auf und sorgt somit dafür, dass spezifische Oberflächenantigene erkennbar werden (Heinzeller 2001).

### **8.3.3 Färbung**

Die verwendeten Farblösungen wurden, wenn nicht im Folgenden gesondert hervorgehoben, gebrauchsfertig von der Firma „Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig“ bezogen.

Zunächst wurde von jedem Präparat eine Übersichtsfärbung als H&E-Färbung angefertigt. Dazu wurden die Schnitte zuerst 10 min mit Hämatoxylin nach Gill gefärbt und in einem zweiten Schritt 10 min mit Eosin (10 g in einem Liter a.d. verdünnt) inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe in ein organisches Milieu überführt, zweimal mit Xylol gewaschen und dann mit Cananda Balsam eingedeckt.

Zur Darstellung der Proteoglykane wurde die Safranin O-Färbung genutzt. Diese erfolgte analog der H&E – Färbung in zwei Schritten à 10 min, zunächst mit Safranin O, dann mit Lichtgrün. Der kationische Safranin O-Farbstoff bindet sich dabei stöchiometrisch an die sauren reaktiven Carboxyl- und Sulfonsäuregruppen der Glykosaminoglykane, so dass eine semi-quantitative Abschätzung möglich ist (Romeis 1989b).

Ebenfalls zum Nachweis von sauren Mukosubstanzen wurde die Alcianblau-Färbung angewandt (Romeis 1989a). Dazu wurde nach dem Herstellen eines sauren Milieus mit 3% Essigsäure im ersten Schritt eine 30 minütige Färbung mit einer 1% Alcianblau-Lösung 8GX (pH 2,5) durchgeführt. Daraufhin erfolgte in einem zweiten Schritt die Gegenfärbung der Zellkerne mit Kernechtrot für 4 min. Nach einer Waschung mit a.d erfolgte das übliche Überführen in ein organisches Milieu durch die aufsteigende Alkoholreihe, gefolgt von zweimaligem Waschen mit Xylol und Einbettung der Schnitte in Canada-Balsam.

Die Elastica van Gieson-Färbung diente der Suche nach elastischen Fasern. Dazu wurden die Schnitte nach einer 20 minütigen Färbung mit Resorcinfuchsin zweimal mit 70% Alkohol behandelt. Im 2. Schritt erfolgte die Färbung mit Weigerts Eisenhämatoxylin A&B (die Teile A und B werden in gleichen Teilen gemischt). Nach mehrmaligen Wässern und kurzer Behandlung mit salzsaurem Alkohol (0.5% HCl in 70% EtOH) erfolgte die 10 minütige Färbung mit Pikrofuchsin. Nach einer abschließenden Inkubation mit 90% Alkohol schloss sich das Eindecken mit Canada Balsam an.

#### 8.3.4 Immunhistologie

Zur Identifikation von bestimmten Zelltypen bzw. Proteinen wurde die Immunfluoreszenzmethode genutzt. Zum Nachweis der spezifischen Bindung des Erstantikörpers diente das an den Sekundärantikörper gebundene Fluorescein (Lottspeich und Zorbas 1998).

Die Vorbehandlung der Schnitte erfolgte wie unter 8.3.2 beschrieben. Wenn eine Vorbehandlung mit Hyaluronidase notwendig war, wurde erst nach mehrmaligem Waschen mit TBS der Erstantikörpers aufgetragen. Dieser wurde mit Albumin-Tris (0,3 g Albumin/10 ml TRIS-Puffer) in seine Endverdünnung gebracht (1:10-1:100). Um in einem Schnitt unterschiedliche

Epitope darstellen zu können, wurden Doppelfärbungen mit zwei Erstantikörpern durchgeführt, von denen der eine einen mausspezifischen und der andere einen kaninchenspezifischen Zweitantikörper benötigte. Dazu wurde jeweils die doppelte Konzentration des Erstantikörpers genommen und die auf diese Weise konzentrierten Antikörper anschließend in einem Verhältnis von 1:1 miteinander vermischt, so dass zum Schluss die Antikörper in der normalen Konzentration der Einfachfärbungen vorlagen. Die Inkubation der Schnitte mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 5°C. Hierauf folgten zunächst mehrere Waschgänge mit TBS, um anschließend die Präparate mit dem fluoreszierenden Zweitantikörper (Verdünnung in Albumin Tris 1:100, Doppelfärbungen entsprechend jeweils 1:50) beschichten zu können. Hierbei betrug die Inkubationszeit zwei Stunden bei Raumtemperatur, wobei die Schnitte auf Grund der Lichtempfindlichkeit des Zweitantikörpers im Dunkeln gelagert wurden. Daraufhin wurde erneut mit TBS gewaschen. Zur besseren Identifikation einzelner Zellen erfolgte noch eine Zellkernfärbung mit DAPI (0,5 µg/ml a.d.) mit einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die Schnitte kurz in a.d. gewaschen, um dann in trockenem Zustand mit dem Antifade Kit eingedeckt zu werden.

Um unspezifische Bindungsreaktionen des Zweitantikörpers auszuschließen, wurde bei jeder Färbung ein Kontrollschnitt angefertigt, der nur mit dem Zweitantikörper inkubiert wurde. Bei der Auswertung der immunhistologischen Bilder sind folgende Faktoren zu beachten. Durch die unterschiedlich starke Eigenfluoreszenz des Gewebes leuchtet das spezifische Grün bzw. Rot des Zweitantikörpers vor einem mal eher grünen, orangefarbenen und mal mehr rotbraunen Hintergrund. Des Weiteren kann es im Randbereich des Schnittes zu unspezifischen Randphänomenen des überschüssigen Zweitantikörpers kommen. Um diesen Störfaktor zu reduzieren, wurden die Zweitantikörper in Magermilchpulver (1%) aufgelöst. Das Magermilchpulver sollte die überzähligen Zweitantikörper binden und absättigen, um weniger unspezifische Reaktionen zu erhalten. Dies war auch sehr erfolgreich. Als zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit aber die DAPI-Färbung hinzukam, musste dieses Verfahren aufgegeben werden, da DAPI in Magermilchpulverlösung ausfällt.

### 8.3.5 Doppelfärbungen mit der Immunfluoreszenzmethode und anschließender H&E-Färbung

Um die Strukturen in der Standardübersichtsfärbung mit H&E genau zu identifizieren, wurde eine Methode entwickelt, um ein und denselben Schnitt sowohl mit der Immunfluoreszenzmethode als auch mit der H&E-Färbung darzustellen. Zunächst erfolgte die immunhistologische

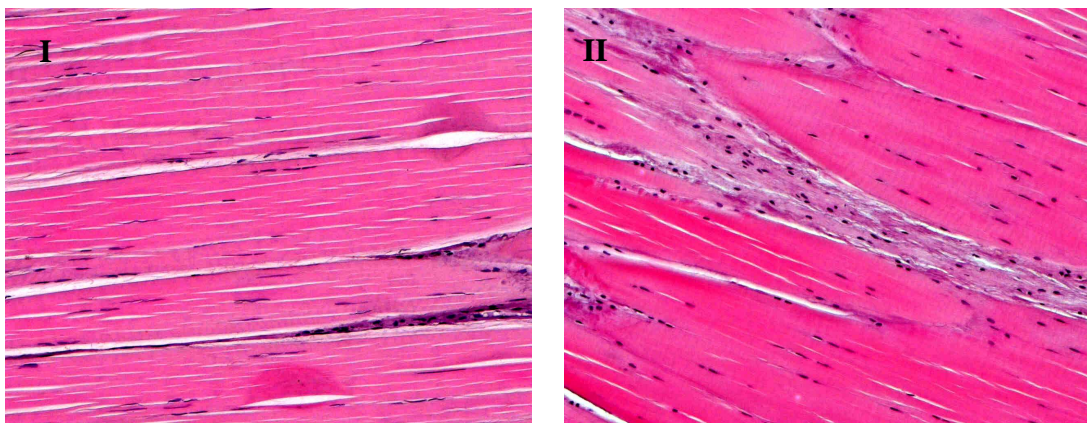


Färbung laut Protokoll (s. 8.3.4). Daraufhin wurden beim Photographieren markanter Stellen die Koordinaten unter Zuhilfenahme eines Koordinatennetzes am Objektisch genau lokalisiert und protokolliert. Der auf diese Weise ausgewertete Schnitt wurde anschließend für mindestens eine halbe Stunde in a.d. gelegt, um dann vorsichtig das Deckgläschen abzulösen. Nach einem Waschvorgang mit a.d. erfolge eine normale H&E Färbung laut Protokoll. Abschließend wurden anhand der protokollierten Lokalisation die bereits photographierten Stellen der immunhistochemischen Färbung erneut als H&E-Färbung photographiert, um dann mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware „Adobe Photoshop“ zu einem Bild zusammengefügt zu werden.

### 8.3.6 Auswertung der histologischen Schnitte

Die Auswertung der Sehnen der Vergleichsgruppe wurde anhand der unter 8.1.1 erwähnten Regionen I, II und III (Abb. 9) durchgeführt.

Es erfolgte eine zusätzliche Unterteilung der Sehnenregion II in der Frontalebene, wie bereits in der Literatur beschrieben, in drei Zonen (Petersen et al. 2004). Die Zone 1 umfasste die innenknöchelnahe Sehnenregion, die darunter liegende Zone 2 stellte den Übergang zur Zone 3 dar, die oberflächlich und damit zum Retinaculum flexorum gelegen war (Abb. 8).



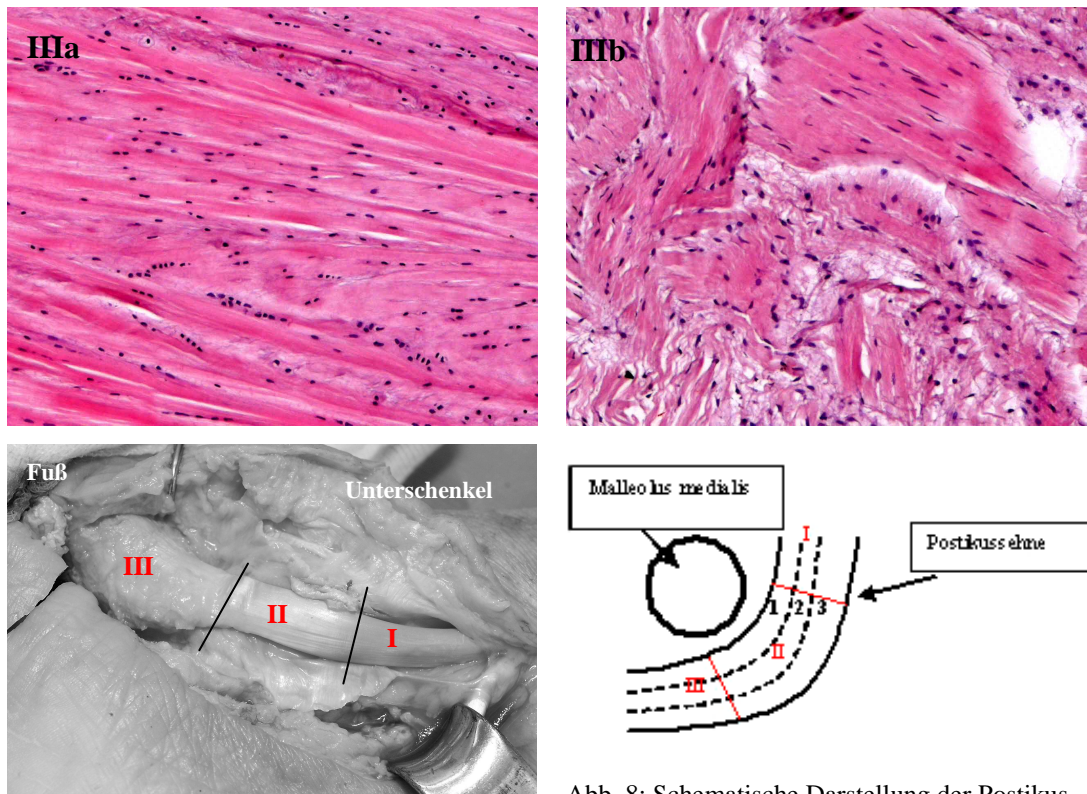


Abb. 8: Schematische Darstellung der Postikussehne (Region I-III) im Verlauf um den Malleolus medialis mit der Unterteilung im Querschnitt (Zone 1-3).

Abb. 9: Regionendarstellung I-IIIb in H&E-Färbung; Region IIIa zeigt den proximalen Abschnitt der Sehne, bevor sie sich in der Region IIIb fächerförmig aufzweigt.

Da die Sehnenpräparate bei Tibialis-posterior-Dysfunktion durch das befundadaptierte Debridement der Sehne gewonnen wurden, lag zur weiteren Auswertung lediglich ein Teilstück der Sehne vor. Dieses wurde je nach Länge des Operationspräparates in ein proximales Stück (Richtung Muskelbauch, entspricht ungefähr Region II) und in ein distales Stück (Richtung Knochenansatz, entspricht ungefähr Region III) geteilt. Teilweise reichte es auch nur für ein histologisches Präparat.

Aufgrund der Tatsache, dass die „gesunde“ Sehne im Ganzen entnommen werden konnte und die Operationspräparate bei Pes planovalgus lediglich als Teilstück, konnte keine statistische Auswertung bezüglich der quantitativen Unterschiede bestimmter Zellpopulationen durchgeführt werden.

## 8.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

### 8.4.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Isolation erfolgte unter Zuhilfenahme des Säulensystems NucleoSpin® RNA II und wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurde die bei -80°C tiefgefrorene Probe mit einer RNase-freien Schere zerkleinert, die Zellen lysiert und das so entstandene Lysat gefiltert, damit anschließend die RNA an der Säulenmembran gebunden werden konnte. Daraufhin erfolgte ein Entsalzen der Membran, gefolgt von dem Abbau der DNA durch Zugabe von DNase. Nach mehrmaligem Waschen der Membran konnte die reine RNA eluiert werden.

### 8.4.2 Reverse Transkription

Im Anschluss an die RNA-Isolation erfolgte zunächst eine Denaturierung über 6 min bei 60°C. Für die Umwandlung der RNA-Probe in cDNA wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen (Angaben für 40 µl RNA-Probe):

Incubation der RNA-Probe zusammen mit 6,28 µl RT-Puffer (Omniscript™), 6,28 µl dNTP Mix (1mM/dNTP), 6,28 µl Oligo dT, 0,78 µl RNase Out, 3,14 µl reverse Transkriptase (Omniscript®) für eine Stunde bei 37°C.

Die so gewonnene cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung in der PCR bei -20°C gelagert.

### 8.4.3 PCR

Um die durch die reverse Transkription gewonnenen spezifischen DNA-Sequenzen in ausreichender Menge mit der PCR zu amplifizieren, wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen: Der PCR-Ansatzes bestand aus 2 µl cDNA-Probe und je 1 µl Primer (10µmol) upstream und downstream, sowie 12,5 µl Qiagen Master Mix [Zusammensetzung laut Herstellerangaben: 2,5 U Taq DNA Polymerase + 1x Qiagen PCR Puffer (enthält 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) + 200 µM von jeder dNTP] und 8,5 µl reines H<sub>2</sub>O.

Tabelle 2 zeigt die untersuchten Zielgene mit den entsprechenden Primer-Sequenzen, die Länge des PCR-Produktes in Basenpaaren (bp) sowie die jeweiligen Annealing-Temperatur.

Gen	Primer	Sequenz	Länge PCR-Produkt [bp]	Annealing-Temp. [°C]
GAPDH	up	5'-CAT CAC TGC CAC CCA GAA GA-3'	254	60
	down	5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3'		
Col 1A2	up	5'-AGA CCC AAG GAC TAT GAA GT-3'	509	55
	down	5'-ACA TCA TTA GAG CCC TGT AG-3'		
Col 2A1	up	5'-CAT CTG GTT TGG AGA AAC CAT C-3'	604	60
	down	5'-GCC CAG TTC AGG TCT CTT AG-3'		
Col 3A1	up	5'-GAT GGG GTC AAA TGA AGG TGA-3'	546	60
	down	5'-GCA GAT GGG CTA GGA TTC AAA-3'		
Col 6A2	up	5'-CAG AAG GGA AGA CAG GGA GA-3'	359	60
	down	5'-CCA TTG TTG CCT TGA TAC CC-3'		
Aggrecan	up	5'-ACT TCC GCT GGT CAG ATG GA-3	110	55
	down	5'-TCT CGT GCC AGA TCA TCA CC-3'		
VEGF	up	5'-AAG TGG TCC CAG GCT GCA-3'	293	60
	down	5'-ATC TCT CCT ATG TGC TGG CC-3'		
TGF β	up	5'-CGG CAG CTG TAC ATT GAC TT-3'	270	56
	down	5'-AGC GCA CGA TCA TGT TGG AC-3'		
Sox9	up	5'-ACA CAC AGC TCA CTC GAC CTTG-3'	120	60
	down	5'-GGA ATT CTG GTT GGT CCT CTC T-3		

Tabelle 2: PCR-Primer

Als Positivkontrolle diente das Housekeeping Enzym GAPDH.

Die Primer wurden ihrer optimalen Temperatur für die PCR zugeordnet. Diese wurde nach folgendem Standardprotokoll mit 40 Zyklen durchgeführt:

1. Denaturierung: T = 95° C 3'
2. Denaturierung: T = 94° C 30''
3. Annealing: T = 60° C 45'' (Gradient 5°C)
4. Polymerisierung: T = 72° C 45''
5. Final elongation: T = 72° C 10'

Mit Hilfe der Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung der amplifizierten DNA-Produkte. Als Gel wurde dabei ein 3%-iges Agarose-Gel verwendet (1,5 g Agarose/50 ml TBE-Puffer), das mit 2,5 µl Ethidium Bromid (EthBr) (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) versetzt wurde. Die Elektrophorese-Pufferlösung bestand aus 300 ml TBE und 15 µl EthBr (10 mg/ml). Das Gel wurde mit jeweils 3 µl Ladepuffer Orange G (1% Orange G in 1 ml 25mM EDTA lösen + 1

ml 50% Glycerin) pro 10 µl DNA-Probe bestückt sowie mit 5 µl des Markers pUC 19 Msp I. Die Elektrophorese erfolgte über 90 min (100 V/ 400 mA).

#### 8.4.4 Auswertung der PCR

Die Auswertung der PCR erfolgte unter rein qualitativen Gesichtspunkten, da eine RNA-Isolation lediglich bei drei Operationspräparaten und zwei Proben der Vergleichsgruppe gelang und somit eine statistische Auswertung nicht möglich war. Es wurde auch auf eine semi-quantitative Auswertung verzichtet, da die Ergebnisse der PCR lediglich der Verifikation der Immunhistochemie dienten.

## 9. Ergebnisse

### 9.1. Histologische Übersichtsbeschreibung der Tibialis-posterior-Sehne

#### 9.1.1. „Gesunde“ Vergleichsgruppe

Oberhalb des Innenknöchels (Region I) zeichnete sich die Postikussehne durch schmale Tenozyten und einen parallelen Kollagenfaserverlauf aus (Abb. 10). Sie war umgeben von einem bindegewebigen Peritendineum sowie unterteilt durch ein Endotendineum, das die die Sehne versorgenden Gefäße und Nerven enthielt.

Im Bereich der Regio malleolaris medialis (Region II) trat zu den Tenozyten eine weitere Zellpopulation hinzu. Diese wies einen chondrozytenähnlichen Phänotyp auf und präsentierte sich häufig in einer perlschnurartigen Anordnung (Abb.13). Richtung Innenknöchel zeigte sich eine zahlenmäßige Zunahme der chondrozytenähnlichen Zellen. Im Durchschnitt ließen sich in der Region II ca. 20 solcher Zellen /  $0,25 \text{ mm}^2$  nachweisen.

Unterteilt man die Sehne zusätzlich in der Frontalebene, wie unter 8.3.6 beschrieben, lässt sich ein charakteristisches Verteilungsmuster der Zellen mit Chondrozytenphänotyp innerhalb dieses Sehnenabschnittes erkennen:

- in der Zone 1 waren fast ausschließlich chondrozytäre Zellen nachweisbar (Abb.12),
- in der Zone 3 hingegen die für die Sehne typischen schmalen Tenozyten,
- die Zone 2 stellte eine Übergangsregion mit den zellulären Charakteristika der Zone 1 und 3 dar (Abb. 13).

In der Übersichtsaufnahme zeigte sich, wie bereits in der Literatur beschrieben, dass die Zone 2 die breiteste der drei Zonen war (Petersen et al. 2004). Sowohl das Endo- als auch das Peritendineum waren in diesem retromalleolären Sehnenabschnitt nur sehr spärlich ausgeprägt, so dass sich in der Region II kaum Gefäße darstellen ließen.

In der Region III nahmen die chondrozytären Zellen quantitativ immer mehr zu, so dass sich kurz vor dem Knochenansatz kaum noch Tenozyten fanden. Die Sehne enthielt hier durchschnittlich ca. 95 chondrozytäre Zellen/  $0,25 \text{ mm}^2$ .



Die bis zur Region III parallele Kollagenfaserausrichtung löste sich in distaler Richtung durch den fächerförmigen Sehnenansatz allmählich auf (Abb. 14, 15).

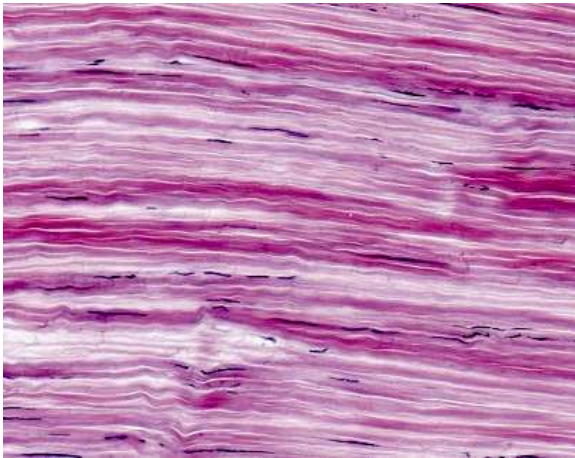


Abb. 10: Region I (proximal des Malleolus medialis): Schmale Tenozyten und paralleler, leicht gewellter Kollagenfaserverlauf. Objektivvergrößerung 10X, Färbung H&E.

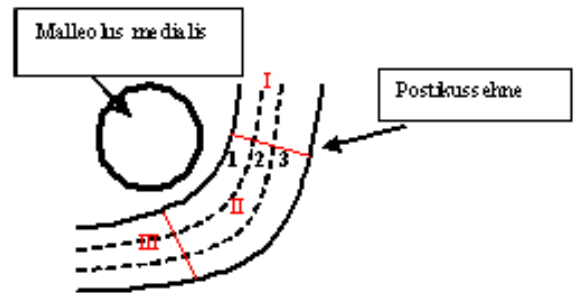


Abb. 11: Schematische Darstellung der Postikussehne (Region I-III) im Verlauf um den Malleolus medialis mit der Unterteilung im Querschnitt (Zone 1-3).

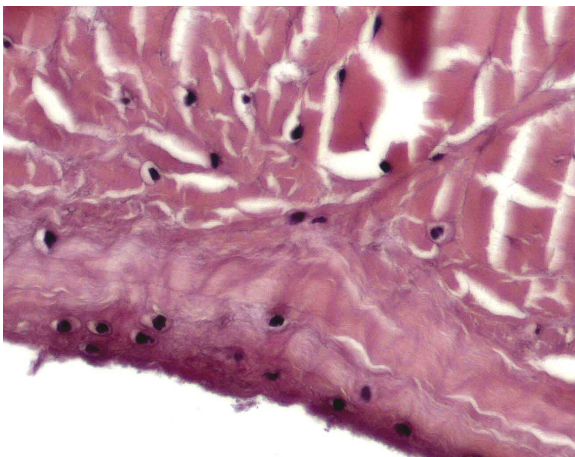


Abb. 12: Region II ( Regio retromalleolaris), Zone 1. Hier sind fast ausschließlich chondrozytäre Zellen nachweisbar. Unten im Bild befindet sich der Sehnenabschnitt, der dem Malleolus medialis anliegt. Objektivvergrößerung 40X, Färbung H&E.

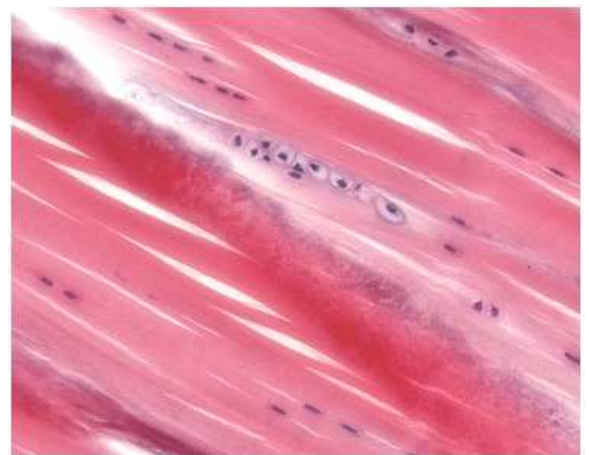


Abb. 13: Region II, Zone 2 (Regio retromalleolaris): Deutlich zu erkennen ist der chondrozytenähnliche Phänotyp sowie die perlschnurartige Zellanordnung. Objektivvergrößerung 20X, Färbung H&E.



Abb. 14: Region IIIa: (distal des Malleolus medialis) Hier fanden sich fast ausschließlich knorpelzellähnliche Zellen, die auch hier zum Teil perlschnurartig angeordnet waren. Objektivvergrößerung 10X, Färbung H&E.

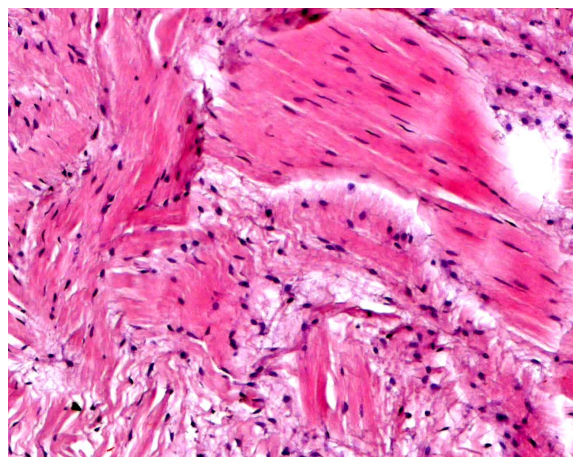


Abb. 15: Region IIIb (ansatznah): Zunehmend unregelmäßige Sehnenstruktur mit Verflechtung der Kollagenfasern. Dadurch finden sich sowohl längs- als auch querangeschnittene Sehnenabschnitte. Objektivvergrößerung 10X, Färbung H&E.

### 9.1.2. Operationspräparate

Die untersuchten Sehnenproben wurden intraoperativ in der makroskopisch veränderten Region entnommen. Dies war meist am Übergang der Regio retromalleolaris zur Regio inframalleolaris, da hier, wie auch in der Literatur beschrieben, am häufigsten pathogene Veränderungen vorgefunden wurden (Jahss 1982, Mosier et al. 1998). Dies entspricht, wie oben angegeben, dem Übergang der Region II zur Region III (Abb. 16, 17).

Die Postikussehne bei Pes planovalgus zeichnete sich durch eine Aufhebung des parallelen Kollagenfaserverlaufes sowie einer im Vergleich zur gesunden Sehne deutlich reduzierten Anzahl chondrozytenähnlicher Zellen aus. Im Durchschnitt ließen sich 25 solcher Zellen/ $0,25\text{mm}^2$  nachweisen. Zellen mit chondrozytärem Phänotyp waren meist in kleinen Zellnestern (Zweier- bis Viergruppen) organisiert. Die für die „gesunden“ Vergleichspräparate typische perlschnurartige Anordnung der Zellen war nur selten vorhanden. Die Zellen lagen zum Teil vereinzelt in der extrazellulären Matrix. (Abb.20)

In den OP-Präparaten war im Vergleich zur „gesunden“ Sehne eine deutliche Zellzahlvermehrung zu verzeichnen. Diese war sowohl durch reaktive Fibroblasten (Abb. 18) als auch durch Gefäßneubildungen entstanden, wie das Nachfärben (H&E) von immunhistologischen Schnitten, die den Gefäßendothelmarker CD31 darstellten, verdeutlichte (Abb.21). Im Vergleich zur eher hypovaskulären „gesunden“ Sehne lagen diese neugebildeten Gefäße meist gruppiert und schienen das umliegende Gewebe förmlich zu infiltrieren (Abb.21).



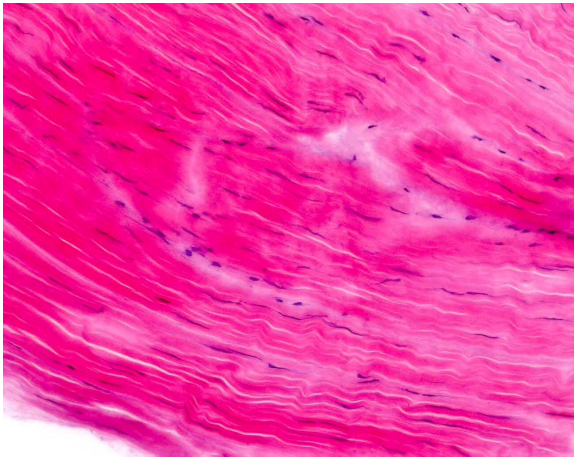


Abb. 16: Präparat (Region I/II): Paralleler Kollagenfaser-  
verlauf mit Tenozyten als dominierender Zellpopulation.  
Objektivvergrößerung 10X. Färbung H&E.

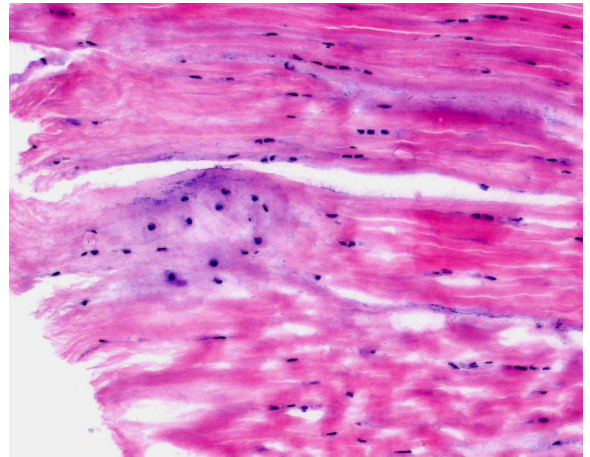


Abb. 17: Präparat (Übergang Region II zu III): Zel-  
len mit chondrozytenähnlichem Phänotyp, zum Teil  
in clusterähnlicher Anordnung. Objektivvergröße-  
rung 10X. Färbung H&E.

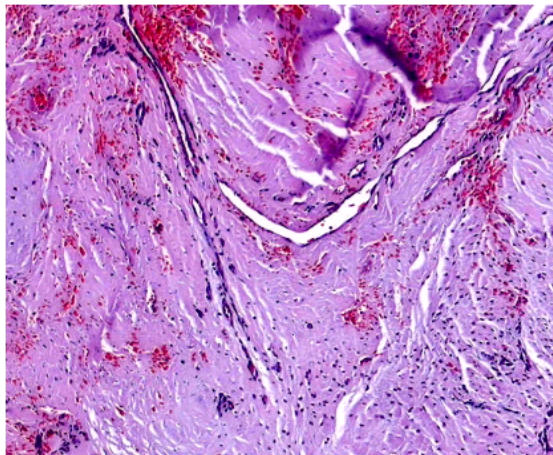


Abb. 18: Gefäßneubildungen begleitet von einer allgemei-  
nen Zellzahlvermehrung. Vor allem im oberen Teil des  
Bildes sind Einblutungen in die Sehne zu sehen. Es präsen-  
tiert sich das Bild eines Granulationsgewebes. Färbung  
H&E. Objektivvergrößerung 10X.

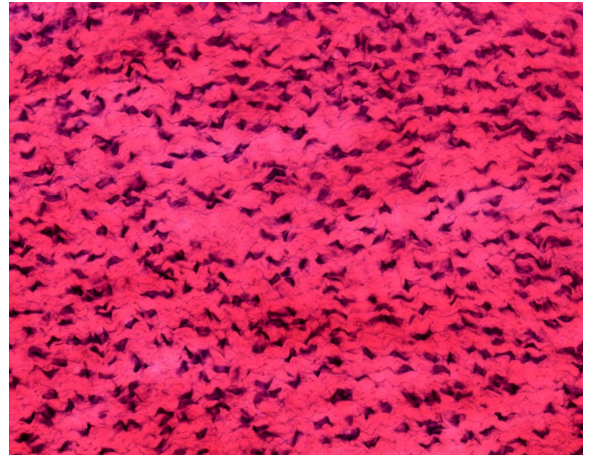


Abb. 19: Fibroblasten als dominierende Zellpopula-  
tion. Zu beachten ist die deutliche Zellzahlvermeh-  
rung. Färbung H&E. Objektivvergrößerung 20X.

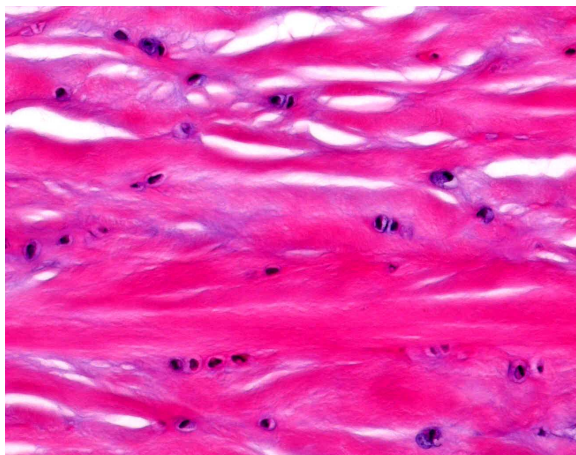


Abb. 20: Präparat (Region II): Reduzierte Anzahl an chondrozytenähnlichen Zellen mit Zellnestern (Zweier- bis Vierergruppen). Objektivvergrößerung 20X. Färbung H&E.

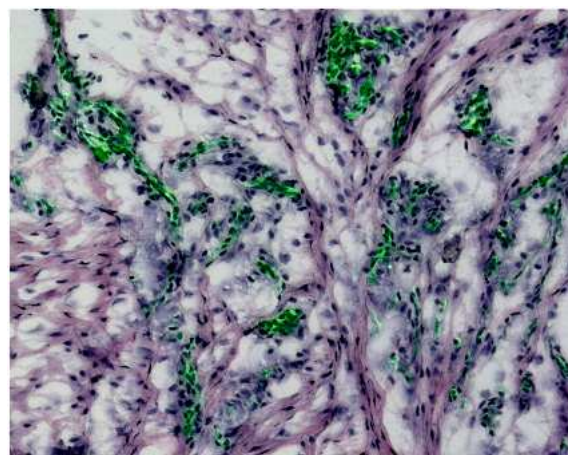


Abb. 21: Gefäßneubildungen (Endothelmarker CD31) mit anschließender H&E-Färbung, Objektivvergrößerung 10X.

Ein nachvollziehbarer Riss innerhalb der Sehnenprobe ließ sich nur in drei Sehnen nachweisen. In diesen Fällen fand sich vor allem in Rissnähe eine deutliche Zellzahlvermehrung (Abb.22). Eine Inkubation dieser Schnitte mit einem Antikörper gegen den Gefäßendothelmarker CD31 zeigte, dass auch hier die Zellzahlvermehrung häufig durch Gefäßneubildungen bedingt wurde (Abb.23).

Auch makroskopisch noch intakte OP-Präparate enthielten mikrostrukturell bereits schollig degeneriertes Sehngewebe, wobei diese Anteile auffallend in Längsrichtung angeordnet waren (Abb.24). Innerhalb solcher basophilen, schollig degenerierten Sehnenabschnitte dominierte eine runde Zellpopulation, die in großer Anzahl innerhalb der extrazellulären Matrix lag und eine verstärkte Mitoseaktivität im Vergleich zur gesunden Sehne zeigte (Abb.24, 25).



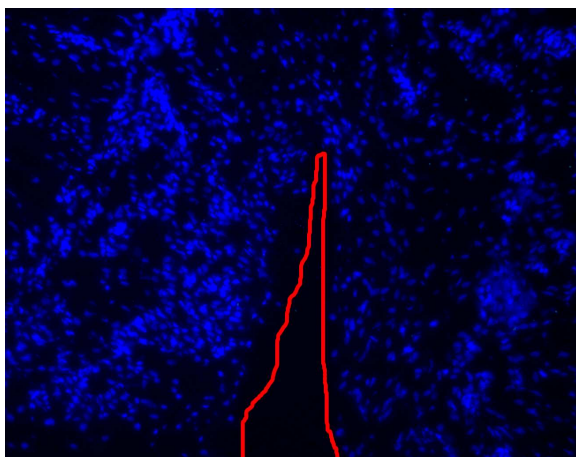


Abb. 22: Rot markiert ist der deutlich zu erkennende Riss. Zu sehen ist die Zellzahlvermehrung in Rissnähe, dargestellt durch den Zellkernmarker DAPI. Objektivvergrößerung 10X.

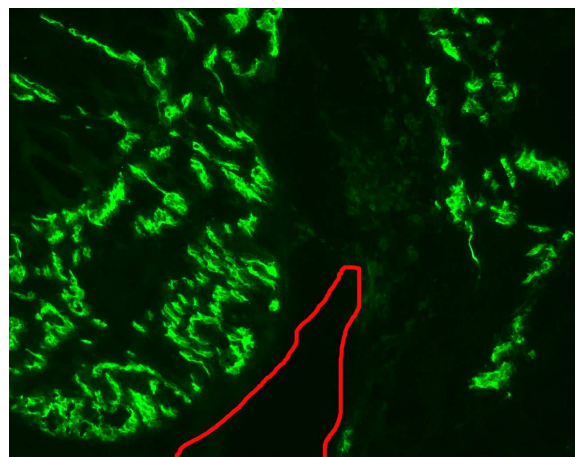


Abb. 23: Rot markiert ist der Riss. Die Gefäße sind mit Hilfe des Gefäßendothelmarkers CD31 dargestellt. Deutlich zu sehen die verstärkte Gefäßneubildung in der Nähe des Risses. Objektivvergrößerung 10X

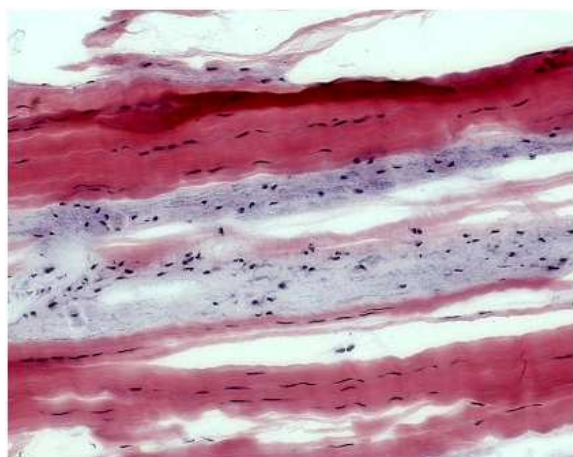


Abb. 24: Schollig degeneriertes Sehngewebe bei einer makroskopisch intakten Sehne. Zu beachten ist die rundzellige Zellpopulation in dem degenerierten Sehnenabschnitt. Objektivvergrößerung 10X. Färbung H&E.

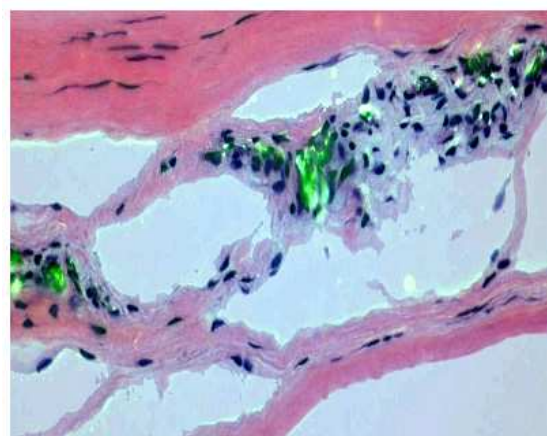


Abb. 25: Verstärkt Mitoseaktivität innerhalb der degenerierten Sehnenabschnitte, dargestellt mittels Mitosemarker Ki67 mit anschließender H&E-Färbung. Objektivvergrößerung 20X.

In den Operationsberichten wurde bis auf eine Ausnahme immer eine Synovialitis beschrieben. In den histologischen Präparaten fanden sich jedoch keine Anzeichen einer akuten oder chronischen Entzündung des Sehngleitgewebes. Lediglich in den drei Sehnen, in denen sich ein Riss nachweisen ließ, war lokal in Rissnähe eine granulationsgewebeähnliche Gewebekomposition nachweisbar (Abb.18).

## 9.2. Untersuchung der Neovaskularisation anhand des Zytokins VEGF

### 9.2.1. Immunhistologische Untersuchung

VEGF gilt unter anderem als Promotor der Gefäßneubildung und wurde genutzt, um die unter 9.1.2 beschriebene Gefäßneubildung der krankhaft veränderten Sehne näher zu untersuchen. Die gesunden Sehnen waren VEGF-negativ.

In den Sehnen bei Tibialis-posterior-Dysfunktion ließ sich eine VEGF-Expression nachweisen. Um Näheres über die Beziehung zwischen VEGF und der Lokalisation von Gefäßen sagen zu können, wurden die VEGF-positiven Präparate zusätzlich mit einem Antikörper gegen das gefäßendothelmarkierende CD31 inkubiert. Da sowohl VEGF als auch CD31 mausspezifische Zweitantikörper benötigten, wurde ein Folgeschnitt, der möglichst nah am VEGF-positiven Präparat lag, mit dem Antikörper gegen CD31 inkubiert. Dabei zeigte sich, dass VEGF hauptsächlich in den Gefäßendothelien sowie dem die Gefäße umgebenden lockeren Bindegewebe lokalisiert war (Abb. 26-29).

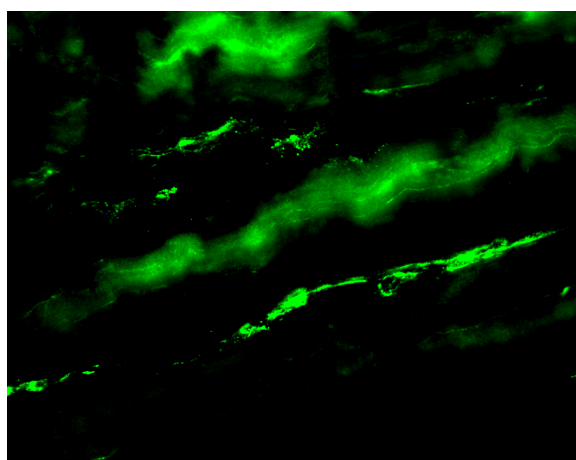


Abb. 26: Endotendineum mit seinen Gefäßen. VEGF-Expression sowohl in den Gefäßendothelien (unterer Bildabschnitt), als auch in dem umgebenden lockeren Bindegewebe (oberer Bildabschnitt). Objektivvergrößerung 40X.

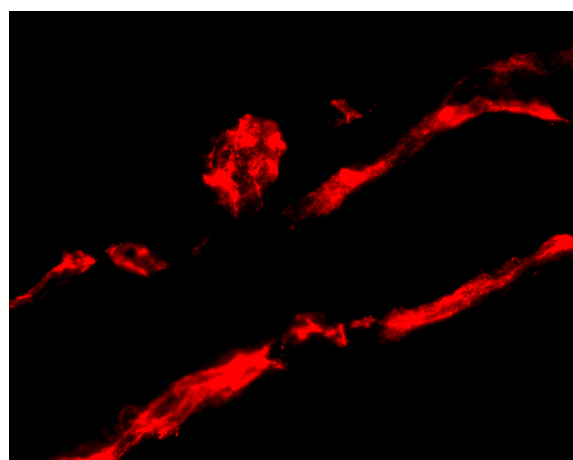


Abb. 27: Gefäßendothelien des Folgeschnittes von Abb. 26 mittels des Endothelmarkers CD31 dargestellt. Objektivvergrößerung 40X.

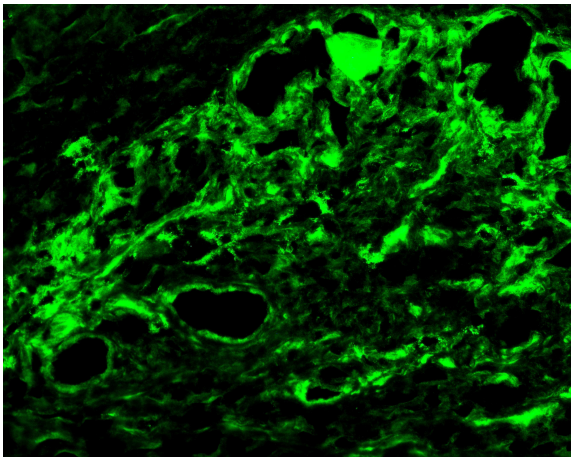


Abb. 28: Starke Vaskularisation des Sehnenabschnitts (vgl. mit Abb.26). Deutlich zu erkennen die vermehrte VEGF Expression. Objektivvergrößerung 20X.

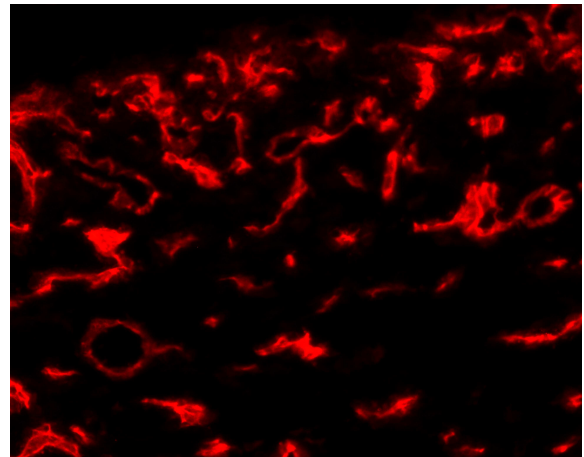


Abb. 29: Folgeschnitt von Abb.28. Dargestellt sind die zahlreichen Gefäße mittels CD31. Objektivvergrößerung 20X.

#### 9.2.1.1. VEGF mRNA

Um zu überprüfen, ob sich in den Sehnen auch mRNA von VEGF nachweisen ließ, wurde sowohl mit drei Operationspräparaten als auch mit zwei Sehnen der „gesunden“ Vergleichsgruppe exemplarisch eine PCR durchgeführt. In den Sehnen der Vergleichsgruppe fand sich keine VEGF mRNA–Expression, in den Operationspräparaten hingegen ließ sich bei beiden Gewebeproben eine VEGF mRNA-Expression nachweisen (Abb. 30, 31).

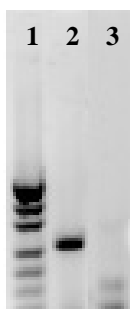


Abb. 30: PCR-Analyse einer Sehne der Vergleichsgruppe

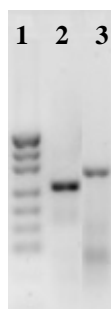


Abb. 31: PCR-Analyse eines Operationspräparats.

- 1) pUC19/MSP I
- 2) GAPDH human – 254 bp
- 3) VEGF human – 293 bp

### 9.3. Extrazelluläre Matrix

#### 9.3.1. Immunhistologische Untersuchung der Sehnen der „gesunden“ Vergleichsgruppe

Für eine genauere Analyse der EZM wurde die Sehne auf das Vorkommen der Kollagene Typ I, II, III und VI geprüft. Die Sehne bestand zum Großteil, wie erwartet, aus Kollagen Typ I. Bei der Kollagen Typ II-Expression ließ sich ein regionenabhängiges Auftreten erkennen. Die Region I besaß bis auf ein Präparat kein Kollagen Typ II, in der Region II fand sich in zwei Präparaten vereinzelt Kollagen Typ II (Abb. 32). Die Region III zeichnete sich durch eine Zunahme des Kollagen Typ II-Gehaltes aus, so dass die Ansatzzone am Knochen selbst fast ausschließlich aus Kollagen Typ II bestand (Abb.33).

Kollagen Typ III fand sich einerseits um die perlschnurartig angeordneten chondrozytären Zellen sowie andererseits regelmäßig in allen Präparaten die Blutgefäße umgebend (Abb. 34, 35).

Kollagen Typ VI war Richtung Knochenansatz quantitativ zunehmend und ohne Beziehung zu einer bestimmten Zellpopulation zu beobachten (Abb. 36).

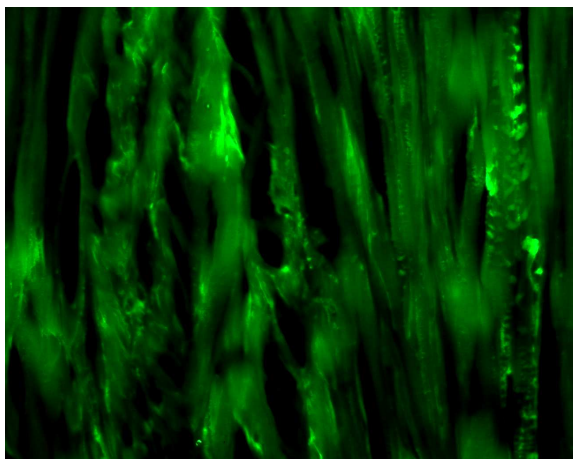


Abb. 32: Region II: Zu sehen ist die vereinzelte Kollagen Typ II-Expression in der „gesunden“ Sehne. Objektivvergrößerung 10X.

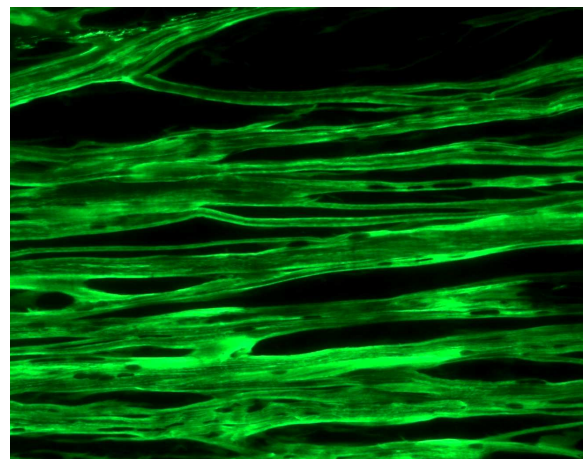


Abb. 33: Region III: Kollagen Typ II-Expression in der „gesunden“ Sehne. Objektivvergrößerung 10X.



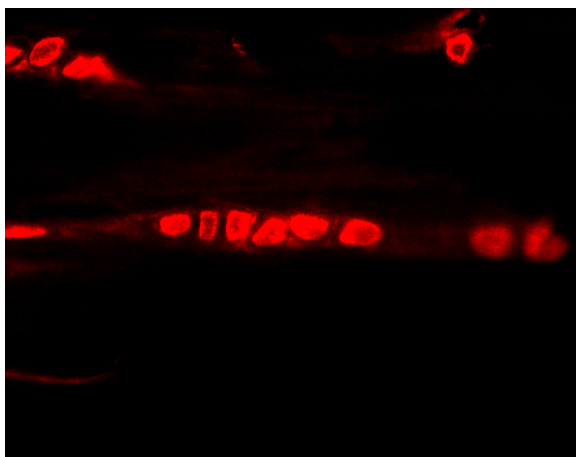


Abb. 34: Region III: Kollagen Typ III-Expression in Umgebung der chondrozytären Zellen (perlschnurartige Anordnung). Objektivvergrößerung 40X.

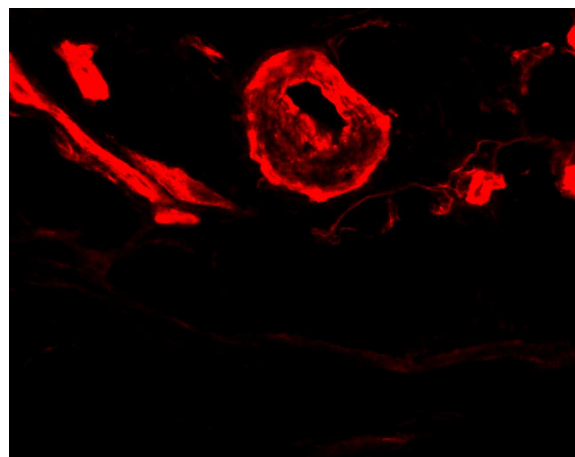


Abb. 35: Gefäß, in dessen Wand sich Kollagen Typ III findet. Objektivvergrößerung 40X.

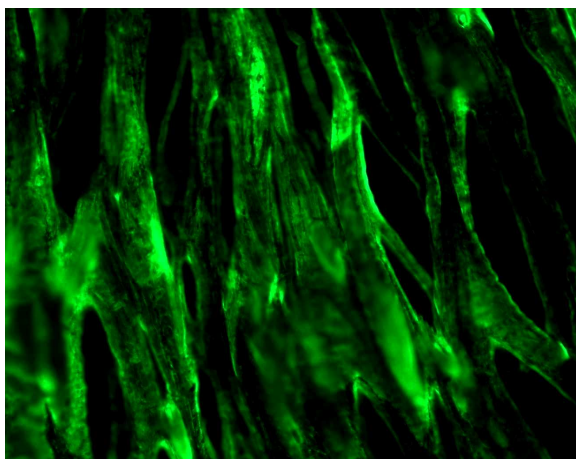


Abb. 36: Region III: Kollagen Typ VI-Expression einer „gesunden“ Sehne. Objektivvergrößerung 20X.

### 9.3.2. Immunhistologische Untersuchung der Operationspräparate

Auch die Sehnen bei Tibialis-posterior-Dysfunktion bestanden zum Großteil aus Kollagen Typ I, jedoch nicht so eindeutig wie in den „gesunden“ Sehnen der Vergleichsgruppe. Kollagen Typ II wurde in vier Sehnenproben gefunden. Wie bei der „gesunden“ Sehne, ließ sich Kollagen Typ II in zunehmendem Maße Richtung Knochenansatz nachweisen (Abb. 37). Kollagen Typ III war vor allem in der Umgebung der Gefäße zu beobachten. Mit steigender Anzahl der Gefäße innerhalb der Operationspräparate nahm auch der Kollagen Typ III-Gehalt zu. Ließ sich ein eindeutiger Riss nachweisen in dessen Nähe sich, wie bereits erwähnt, besonders viele Gefäße neu gebildet hatten, war dort auch der Kollagen Typ III-Gehalt beson-

ders hoch (Abb. 38). Ebenso fand sich eine deutliche Konzentration von Kollagen Typ III in den degenerierten Abschnitten innerhalb der Sehne (Abb. 39).

Kollagen Typ VI war, sofern ein Riss nachweisbar, in dessen Nähe verstärkt vorhanden (Abb. 40). In den übrigen Sehnen fand sich eine diffuse Kollagen Typ VI-Verbreitung innerhalb des Gewebes und zwar qualitativ deutlich mehr als in den „gesunden“ Sehnen. In zwei Präparaten imponierte Richtung Knochenansatz eine Verteilung, die mit dem Vorkommen der chondrozytären Zellen assoziiert war (Abb. 41). Kollagen Typ VI schien sich in diesen Präparaten netzartig von den Zellen mit chondrozytärem Phänotyp ausgehend auszubreiten (Abb.42).

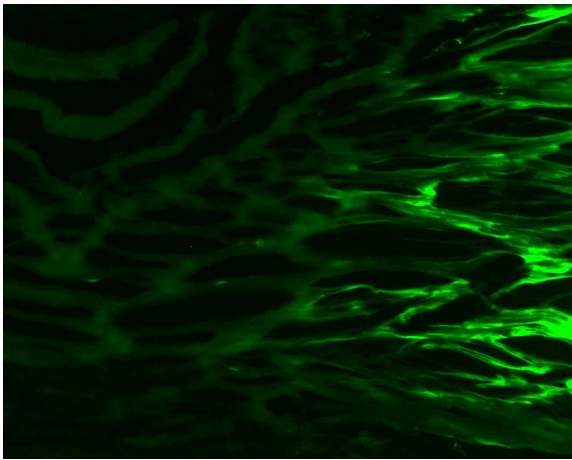


Abb. 37: Region II/III: Kollagen Typ II-Expression. Der linke Teil des Bildes weist nach proximal, der rechte Teil nach distal.

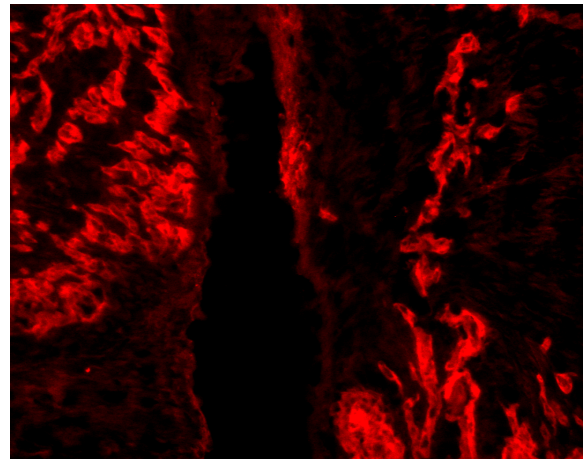


Abb. 38: Präparat mit Rissbildung innerhalb der Sehne, flankiert von einer deutlichen Kollagen Typ III-Expression in Gefäßnähe. (Vergleiche Abb. 23 & 68). Objektivvergrößerung 10X.

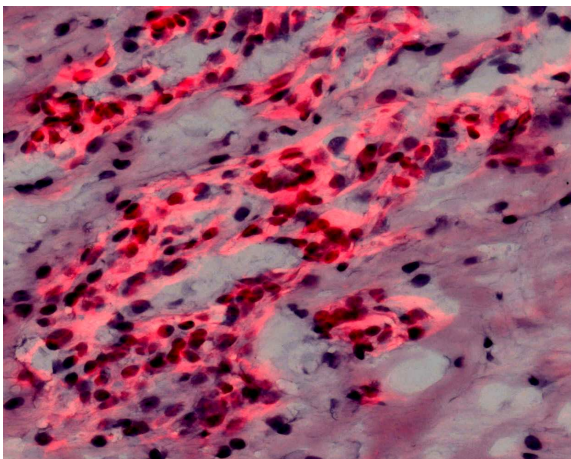


Abb. 39: Kollagen Typ III-Expression mit anschließender H&E-Färbung. Kollagen Typ III findet sich in den degenerierten Sehnenabschnitten, wahrscheinlich auch innerhalb von Gefäßwänden. (Vergleiche Abb. 70). Objektivvergrößerung 20X.

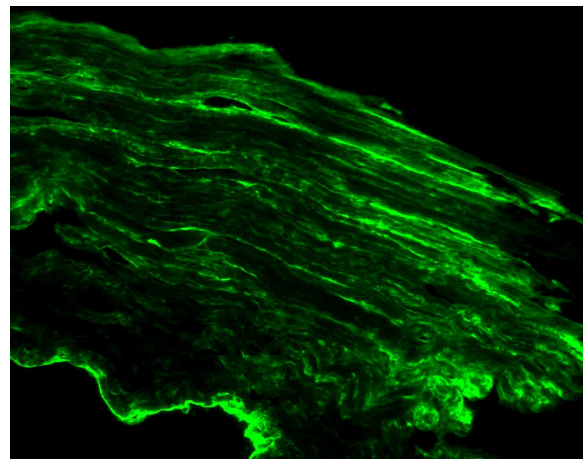


Abb. 40: Kollagen Typ VI-Expression. Unten links im Bildrand befindet sich ein Riss innerhalb der Sehne. Hier ist eine deutlich gesteigerte Kollagen Typ VI-Expression zu verzeichnen. Objektivvergrößerung 10X.



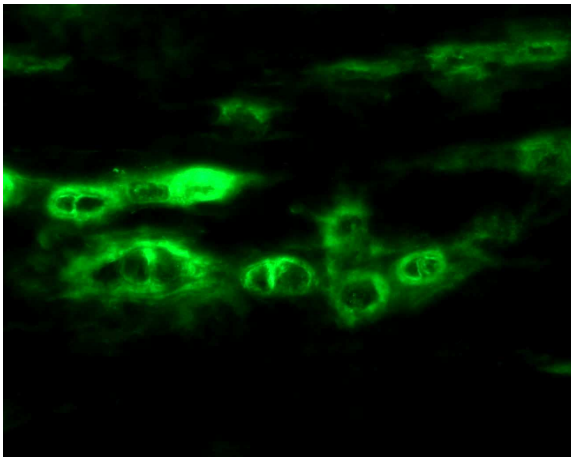


Abb. 41: Kollagen Typ VI-Expression, die mit der Anwesenheit chondrozytärer Zellen assoziiert ist. Objektivvergrößerung 40X.

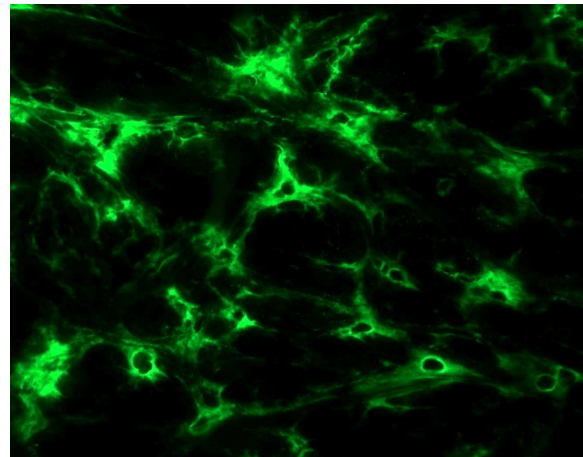


Abb. 42: Kollagen Typ VI-Expression mit netzartiger Verteilung innerhalb der Sehne, die von der chondrozytären Zellpopulation ausgeht. Objektivvergrößerung 20X.

### 9.3.3. mRNA-Expression der Kollagene

Die exemplarisch durchgeführten PCRs an „gesunden“ Sehnen der Vergleichsgruppe sowie Operationspräparaten bestätigten die Befunde der Immunhistologie.

Die Proben der „gesunden“ Sehnen wurden jeweils der Region III entnommen. Bei einer Probe konnte auch aus der Region I mRNA isoliert werden. Die beiden aus der Region III entnommenen Präparate wiesen eine mRNA-Expression aller untersuchten Kollagentypen auf (Typ I, II, III und VI) (Abb. 43). In der Probe aus der Region I war keine Kollagen Typ II mRNA-Expression nachweisbar (Abb. 53).

Die drei untersuchten Operationspräparate zeigten alle eine mRNA - Expression aller untersuchten Kollagene (Abb. 44).

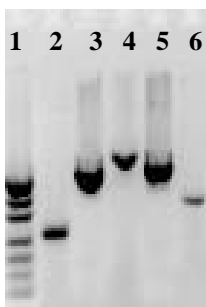


Abb. 43: PCR-Analyse einer „gesunden“ Sehne, Region III.

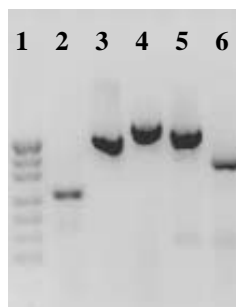


Abb. 44: PCR-Analyse eines Operationspräparats, Region II/III.

- 1) pUC19/MSP I
- 2) GAPDH human – 254 bp
- 3) Col I  $\alpha$  2 human – 509 bp
- 4) Col 2 A 1 – 604 bp
- 5) Col III – 546 bp
- 6) Col 6 A 2 – 359 bp

## 9.4. Analyse der Zellen mit chondrozytärem Phänotyp

### 9.4.1. Untersuchung auf das Vorhandensein von Faserknorpel

#### 9.4.1.1. Histologische Auswertung der „gesunden“ Sehnen (Vergleichsgruppe)

Um nachzuweisen, ob die im H&E-gefärbten Präparat auffallenden Zellen mit chondrozytärem Phänotyp Faserknorpel entsprechen, wurden die Schnitte zunächst mit Safranin O gefärbt. Wie unter 8.3.3 dargestellt, dient diese Färbung der Darstellung von Proteoglykanen, zu denen auch das knorpeltypische Aggrekan gehört (Romeis 1989b). In der Region I ließen sich keine Proteoglykane nachweisen. Die Region II zeigte ebenfalls keine eindeutige Safranin O-Anfärbung. Erst im Übergang zur Zone III ließ sich die Sehne mit Safranin O markieren. In der Region III war eine deutliche Safranin O-Anfärbung zu erkennen. Nach distal nahm die Intensität der Safranin O-Färbung zu (Abb. 45, 46)

Ein vergleichbares Verteilungsmuster zeigte die Alcianblaufärbung, die ebenso der Darstellung von sauren Mukosubstanzen dient (Abb.47, 48).

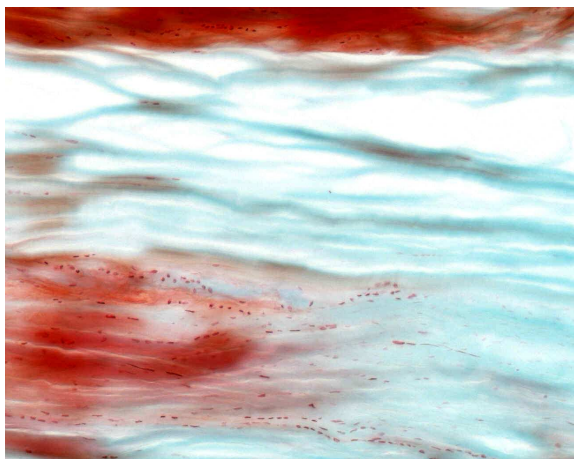


Abb. 45: Region II/III: Zu sehen ist links der Beginn der Safranin O-Anfärbung am Übergang zur inframallöären Region. Objektivvergrößerung 10X

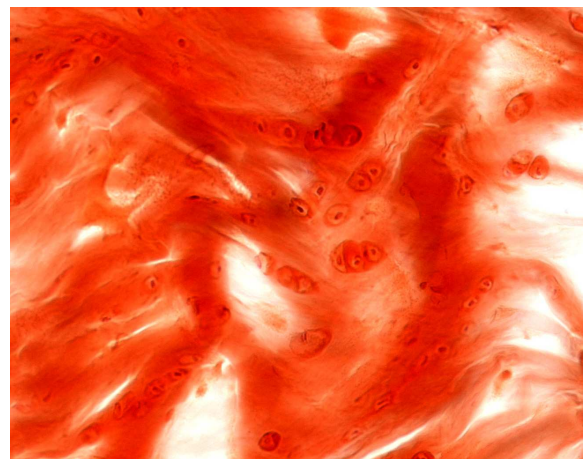


Abb. 46: Region III: Am Knochenansatz intensive Safranin O-Färbung. Zu beachten sind die in Zweier- bzw. Dreierpaaren eingelagerten Zellen mit chondrozytenähnlichen Phänotyp. Objektivvergrößerung 20X

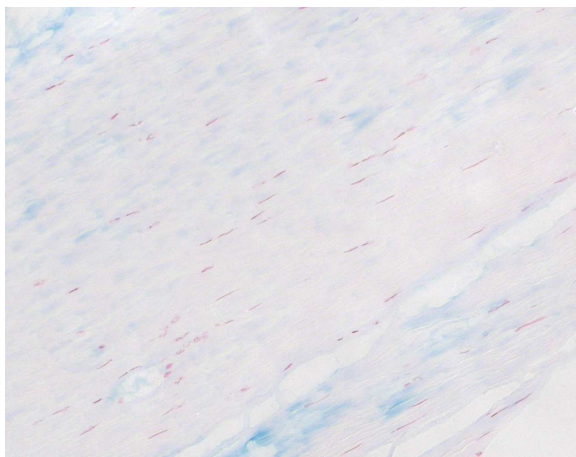


Abb. 47: Region II: Alcianblaufärbung. Geringer Nachweis von sauren Mukopolysacchariden. Objektivergrößerung 10X.

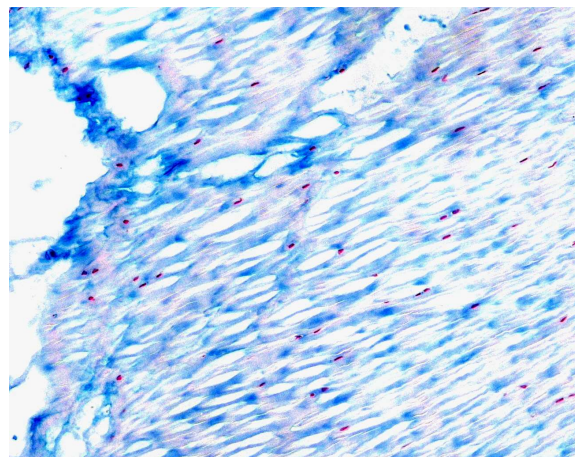


Abb. 48: Region III. Darstellung der sauren Mukopolysaccharide. Objektivergrößerung 10X.

#### 9.4.1.2. Immunhistologische Auswertung der „gesunden“ Sehnen (Vergleichsgruppe)

Zur genaueren Analyse der extrazellulären Matrix auf das Vorhandensein von Faserknorpel wurden die Schnitte zusätzlich mit immunhistologischen Methoden untersucht. Als knorpelspezifische Marker wurden dabei, wie in der Literatur beschrieben, Kollagen Typ II und Aggrecan genutzt (Winter et al. 1998, Deutzmann et al. 2003, Gelse et al. 2003).

Die Kollagen Typ II-Expression wurde bereits ausführlich unter 9.3.1 im Rahmen der Untersuchung der EZM beschrieben. Hier soll deshalb nur noch die lokale Beziehung zwischen der Kollagen Typ II-Expression und den chondrozytenähnlichen Zellen untersucht werden. Diese Zellen fanden sich sowohl in unmittelbarer Nähe von Kollagen Typ II als auch unabhängig davon (Abb. 49, 50). Ein zusätzliches Färben der Kollagen Typ II-positiven Schnitte mit H&E verdeutlichte das von den chondrozytären Zellen unabhängige Auftreten des Kollagen Typ II (Abb. 51).

Als weiteres für die extrazelluläre Matrix des Knorpels typisches Protein wurde die Sehne immunhistologisch auf das Vorhandensein von Aggrecan untersucht. In der Region I konnte Aggrecan immunhistologisch nicht nachgewiesen werden. Lediglich in einem Präparat fand sich Aggrecan in der Region II; in den restlichen Präparaten ließ sich immunhistologisch kein Aggrecan in der Zone II nachweisen. In der Region III war vereinzelt eine diffuse Verteilung des Aggrecans zu sehen (Abb. 52). Da Aggrecan und Kollagen Typ II mit Erstantikörpern dargestellt wurden, die beide einen mausspezifischen Zweitantikörper benötigten, wurden, um

Vergleiche bezüglich der Lokalisation von Kollagen Typ II und Aggrekan anstellen zu können, Folgeschnitte angefertigt, die möglichst nahe beieinander lagen. Diese zeigten, dass Aggrekan sowohl isoliert im Gewebe als auch in räumlicher Beziehung zum Kollagen Typ II vorkam.

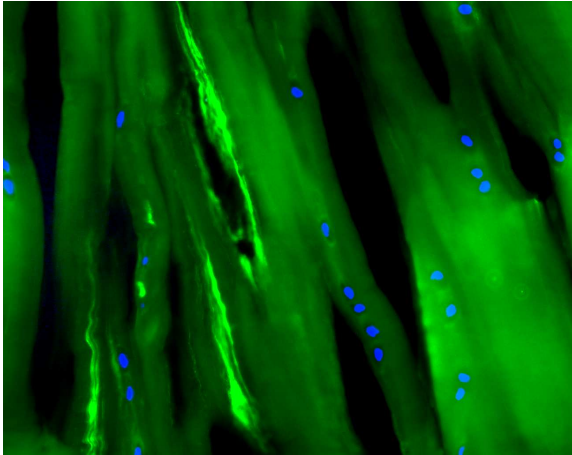


Abb. 49: Region II: Isoliertes Auftreten des Kollagens Typ II. Darstellung der Zellen mittels Zellkernmarker DAPI. Inhomogene Verteilung von Kollagen Typ II in Relation zur Zelllokalisierung. Objektivvergrößerung 20X

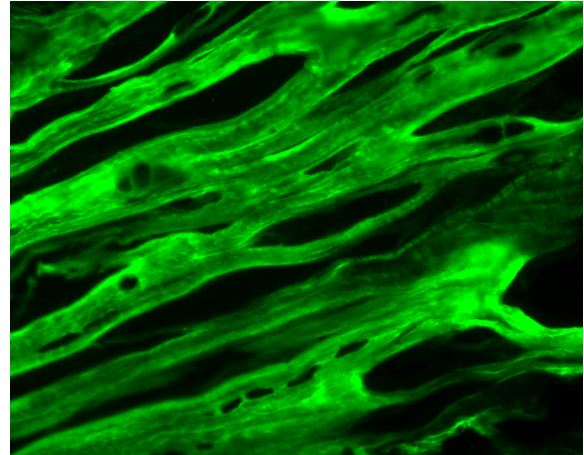


Abb. 50: Region III: Kollagen Typ II-Expression. Deutliche Kollagen Typ II-Anfärbung. Zu beachten sind die als Hohlräume imponierenden Zellkerne, die von ihrer Morphologie her an die Zellen mit chondrozytären Phänotyp erinnern. Objektivvergrößerung 20X

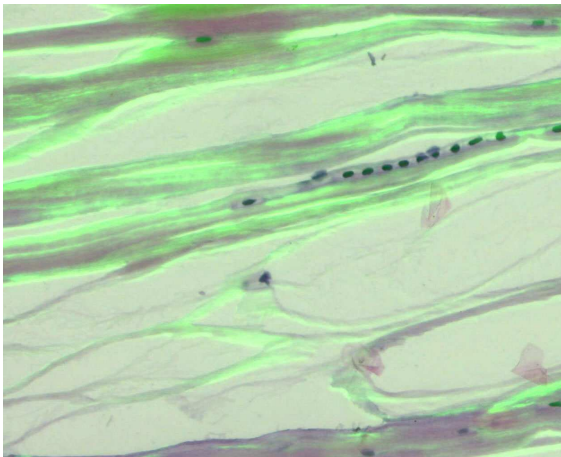


Abb. 51: Region III: Immunhistologische Darstellung der Expression des Kollagens Typ II und H&E-Färbung. Die Kollagen Typ II-Verteilung ist unabhängig vom Vorhandensein der chondrozytären Zellen. Objektivvergrößerung 20X.

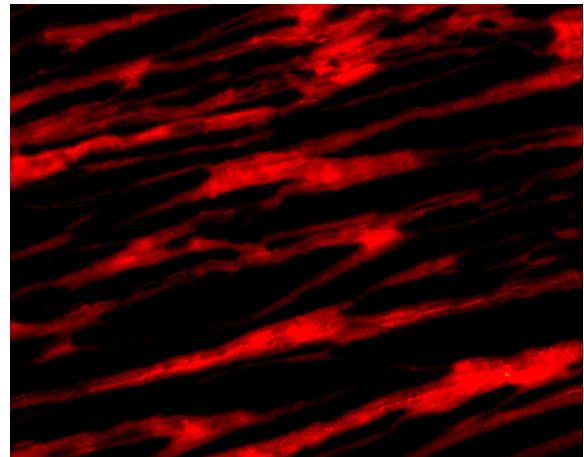


Abb. 52: Region III: Aggrekan-Expression. Zu sehen ist die vereinzelte diffuse Verteilung innerhalb des Gewebes. Objektivvergrößerung 20X.



#### 9.4.1.3. Kollagen Typ II mRNA-Expression der „gesunden“ Sehnen (Vergleichsgruppe)

Durch die immunhistologische Untersuchung konnte lediglich das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von Kollagen Typ II im Gewebe dargestellt werden. Um zu überprüfen, ob sich auch Kollagen Typ II mRNA in den Proben nachweisen ließ, wurde exemplarisch mit zwei Proben eine PCR durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass Kollagen Typ II in der Region I nicht expremiert wurde (Abb.53). In der Region II fand sich in einer Probe eine Kollagen Typ II-Expression, die zweite Probe war negativ. Für die Region III konnte eine Kollagen Typ II-Expression in beiden Proben nachgewiesen werden (Abb. 54, 55).

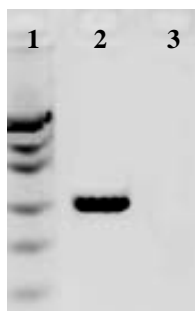


Abb. 53: PCR-Analyse einer „gesunden“ Sehne, Region I

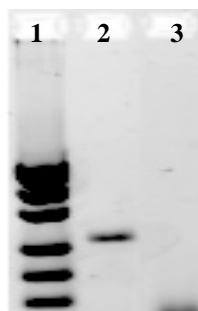


Abb. 54: PCR-Analyse einer „gesunden“ Sehne, Region II



Abb. 55: PCR-Analyse einer „gesunden“ Sehne, Region III

- 1) pUC19/MSP I
- 2) GAPDH human – 254 bp
- 3) Col 2A1 – 604 bp

#### 9.4.1.4. Histologische Auswertung der Operationspräparate

Bei den Operationspräparaten fand sich je nachdem, ob die Probe mehr am Übergang von Region II und III oder aus der Region III entnommen wurde, bei der Alcianblaufärbung eine ähnliche Verteilung der sauren Mukopolysaccharide wie bei der gesunden Sehne mit einer vermehrten Anfärbung inframalleolär. Eine besonders intensive Färbung zeigte sich in der Nähe des Sehnenrisses. Dies war auch vorhanden, wenn der Riss eher proximal lag, also in einer Region, wo sich in der „gesunden“ Sehne keine Mukopolysaccharide fanden (Abb. 56). Eine weitere Intensivierung der Färbung fand sich in der Randzone der Sehne Richtung Innenknöchel.

Analog zur Alcianblaufärbung waren die Schnitte je nach Entnahmezona der Präparate an unterschiedlichen Stellen mit Safranin O anzufärben. Sowohl in der Zone 1 (dem Malleolus medialis anliegende Sehne in der Region II) als auch in distaler Richtung (Region III) fand sich eine besonders intensive Färbung (Abb. 57).

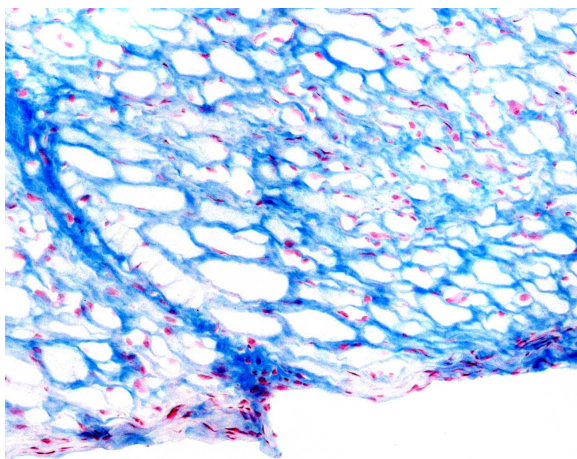


Abb. 56: Alcianblaufärbung: Intensive Anfärbung in der Nähe des sichtbaren Risses. Objektivvergrößerung 10X.



Abb. 57: Zum linken Bildrand hin befindet sich der Sehnenansatz. Oben im Bild befindet sich die Zone 1 Region II. Deutlich verstärkte Safranin O-Färbung der knochennahen Sehnenregion. Objektivvergrößerung 10X.

#### 9.4.1.5. Immunhistologische Auswertung der Operationspräparate

Analog zu den „gesunden“ Sehnen der Vergleichsgruppe wurden die Operationspräparate immunhistologisch auf das Vorhandensein der knorpeltypischen Proteine Kollagen Typ II und Aggrekan untersucht.

Bei den Kollagen Typ II-positiven Proben fanden sich die chondrozytenähnlichen Zellen sowohl eingebettet in Kollagen Typ II als auch unabhängig davon (Abb. 58).

Von den vier Kollagen Typ II-positiven Proben ließ sich bei drei Präparaten auch Aggrekan anfärben. Des Weiteren fand sich Aggrekan auch in einer Kollagen Typ II-negativen Probe. Aggrekan trat sowohl isoliert in der extrazellulären Matrix als auch in der direkten Umgebung der Zellen auf (Abb. 59, 60). Da, wie oben bereits erwähnt, Kollagen Typ II und Aggrekan beide mausspezifische Zweitantikörper benötigten, wurden möglichst nahe beieinander liegende Folgeschnitte angefertigt, die zeigten, dass Kollagen Typ II und Aggrekan an unterschiedlichen Orten in der Sehne lokalisiert waren (Abb. 60, 61).

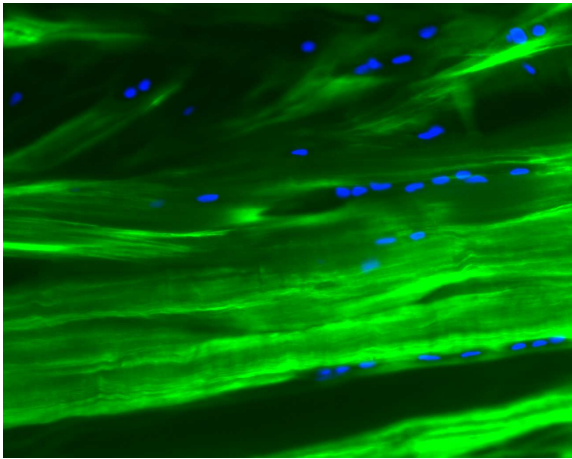


Abb. 58: Kollagen Typ II- und Zellkernanfärbung: Zu beachten ist, dass die Zellen mit chondrozytären Phänotyp sowohl eingebettet im Kollagen Typ II als auch unabhängig davon vorliegen. Objektivergrößerung 20X.

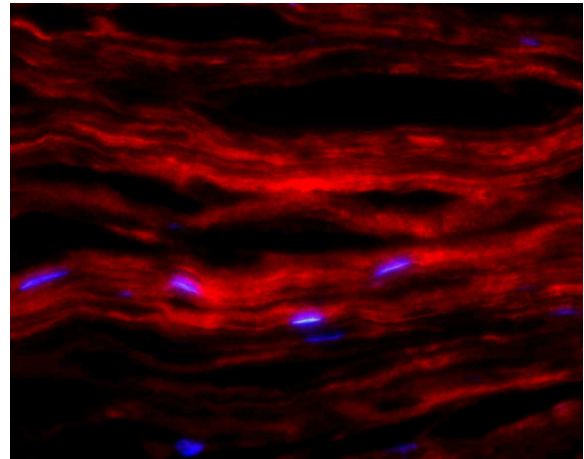


Abb. 59: Anfärbung von Aggrekan und den Zellkernen in einem Folgeschnitt zu Abb. 58. Zu beachten ist die Verteilung von Aggrekan um die Zellkerne. Objektivergrößerung 20X.

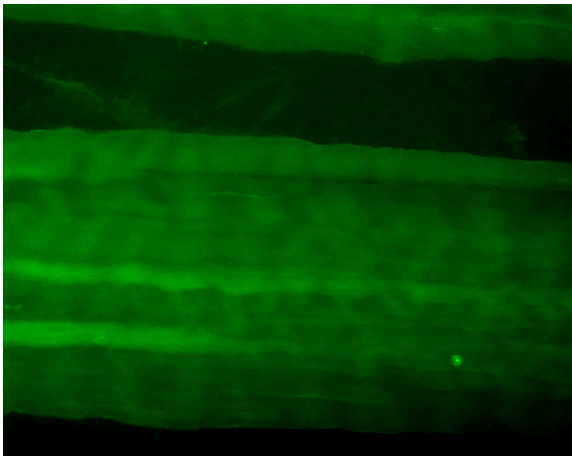


Abb. 60: Kollagen Typ II-negative Sehne. Objektivergrößerung 20X.

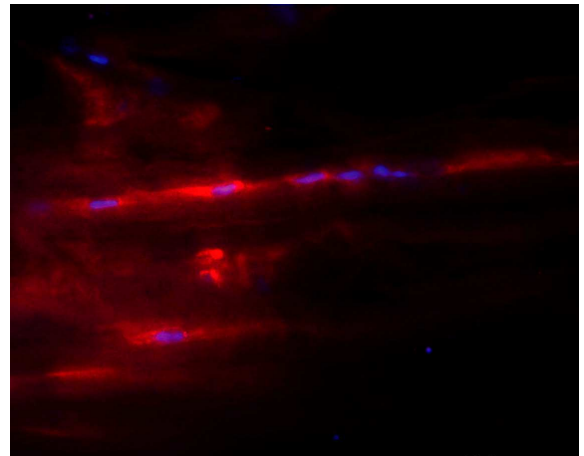
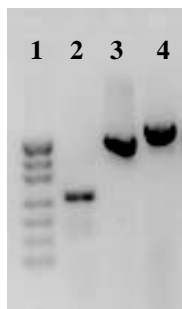


Abb. 61: Anfärbung von Aggrekan und den Zellkernen in einem Folgeschnitt zu Abb. 60: Zu beachten ist die Verteilung von Aggrekan um die Zellkerne. Objektivergrößerung 20X.

#### 9.4.1.6. Kollagen Typ II mRNA-Expression der Operationspräparate

Auch bei den Operationspräparaten wurde exemplarisch mit drei Sehnen eine PCR durchgeführt. Eine Probe zeigte keine Kollagen Typ II-Expression, in den beiden anderen Proben ließ sich cDNA von Kollagen Typ II isolieren. Hierbei ist anzumerken, dass die beiden Kollagen Typ II-positiven Präparate relativ weit distal entnommen wurden und somit am ehesten der Zone III der gesunden Sehne entsprachen (Abb. 62).



- 1) pUC19/MSP I
- 2) GAPDH human – 254 bp
- 3) Col I  $\alpha$ 2 human – 509 bp
- 4) Col2A1human – 604 bp

Abb. 62: PCR-Analyse einer pathogenen Sehne

#### 9.4.2. Untersuchung der Postikussehne auf das Vorhandensein von mesenchymalen Vorläuferzellen

##### 9.4.2.1. Immunhistologische Auswertung der „gesunde“ Sehne der Vergleichsgruppe

Um auszuschließen, dass die Zellen mit chondrozytärem Phänotyp mesenchymale Vorläuferzellen sind, wurden die Präparate auf das Vorhandensein von CD73, CD90, CD105 sowie CD166 untersucht. Da bis auf CD90 alle anderen Marker mausspezifische Zweitantikörper benötigten, wurden, um Vergleiche bezüglich der Lokalisation der positiven Zellen anstellen zu können, Folgeschnitte angefertigt, die möglichst nahe beieinander lagen.

Bei acht von neun Sehnen ließ sich bei diesen Untersuchungen CD105 anfärben. Dabei fanden sich die CD105-positiven Zellen in allen Abschnitten der Sehne. Gegenfärbungen mit H&E zeigten, dass die CD105-positiven Zellen sich meist im Endotendineum befanden, das aus lockerem Bindegewebe bestand und die zu- und abführenden Gefäße enthielt. Die



CD105-positiven Zellen entsprachen somit nicht den im H&E-Präparat auffallenden Zellen mit chondrozytärem Phänotyp (Abb. 63).

CD90 und CD166 ließen sich in keiner Sehne nachweisen.

In einem Präparat fanden sich vereinzelt CD73-positive Zellen in der Region II (Abb. 64).

Diese Zellen waren jedoch nicht gleichzeitig CD105-positiv.

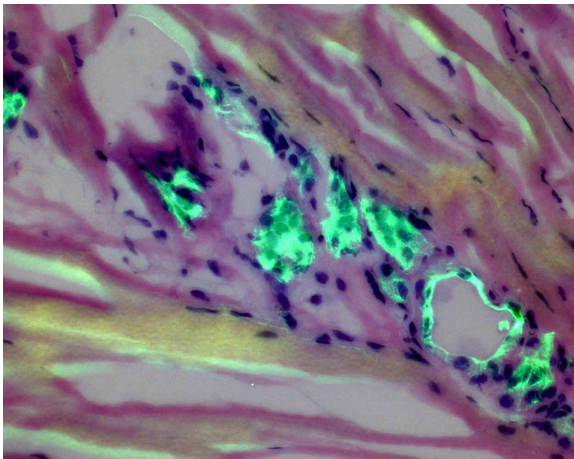


Abb. 63: Zu sehen sind die CD105-positiven Zellen (mit H&E nachgefärbt), die im Endotendineum lagen. Zu beachten die im oberen Bildteil gelegenen perl-schnurartig angeordneten Zellen, die keine Anfärbung für CD 105 zeigten. Objektivvergrößerung 20X.

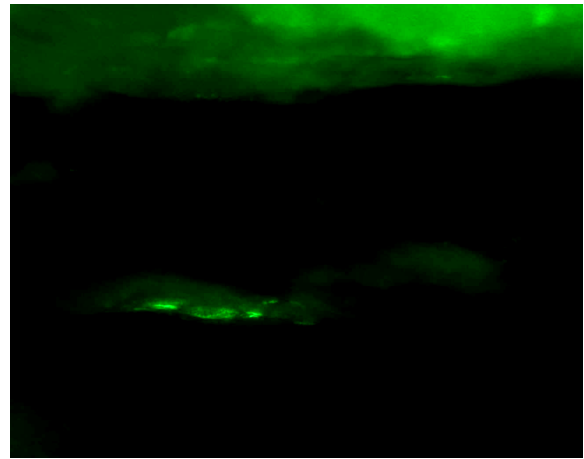


Abb. 64: Zu sehen sind drei Zellen, die CD73-positiv waren. Diese lagen vereinzelt in der Sehne und entsprachen nicht den CD105-positiven Zellen. Objektivvergrößerung 40X.

#### 9.4.2.2. Immunhistologische Auswertung der Operationspräparate

Wie unter 9.4.2.1 bereits erwähnt, gilt auch für die OP-Präparate, dass mit Ausnahme von CD90 alle Marker mausspezifische Zweitantikörper benötigten und deshalb für Vergleiche bezüglich der Lokalisation möglichst nahe beieinander liegende Folgeschnitte angefertigt wurden.

In den Operationspräparaten fanden sich qualitativ mehr Zellen, die CD105-positiv waren als in der gesunden Sehne (Abb. 65). Diese Zellen waren zumeist gleichzeitig CD31-positiv (Abb. 66). CD31 ist ein Endothelmarker, der genutzt wird um Gefäße darzustellen. Ein direkter Vergleich zwischen CD105- und CD31-positiven Zellen zeigte, dass CD105 noch zusätzlich weitere Zellen anfärbte. Die CD105-positiven Zellen wurden von Kollagen Typ III umgeben (Abb. 67).

Enthielt das pathogene Sehnenmaterial eine eindeutige Rissstelle, waren in dessen Nähe deutlich mehr CD105-positive Zellen zu beobachten als in der restlichen Sehne (Abb. 68).

Ein zusätzliches Färben der CD105-positiven Schnitte mit H&E zeigte, dass die unter 9.1.2 erwähnten runden Zellen innerhalb der basophilen, degenerierten Sehnenabschnitte nahezu alle CD105-positiv waren (Abb. 69).

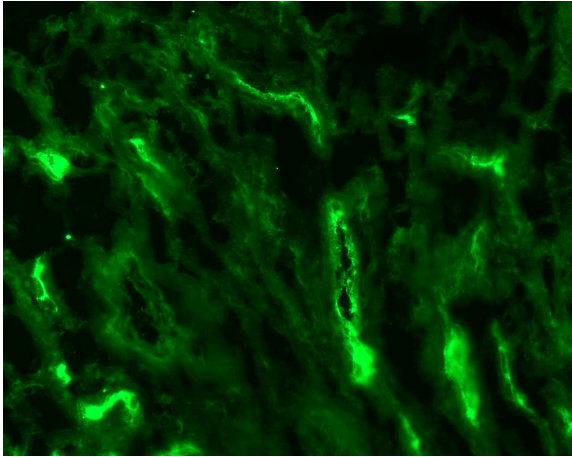


Abb. 65: CD105-Anfärbung in einem Operationspräparat. Objektivvergrößerung 20X.

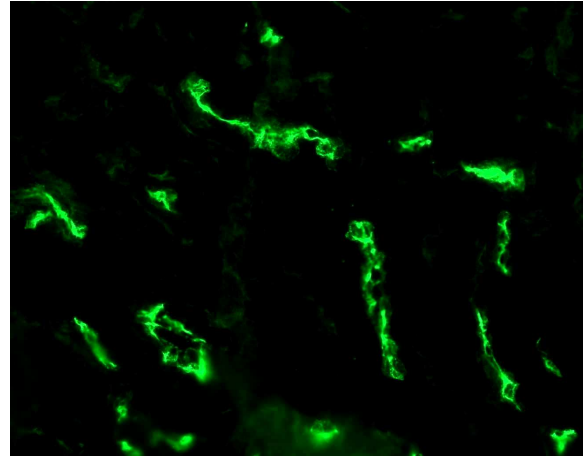


Abb. 66: CD31-Anfärbung in einem Folgeschnitt von Abb. 65: Zu sehen ist, dass die CD105-positiven Zellen überwiegend auch CD31-positiv sind. Zu beachten ist die hohe Dichte der durch den Gefäßendothelmarker CD 31 dargestellten Gefäße. Objektivvergrößerung 20X.

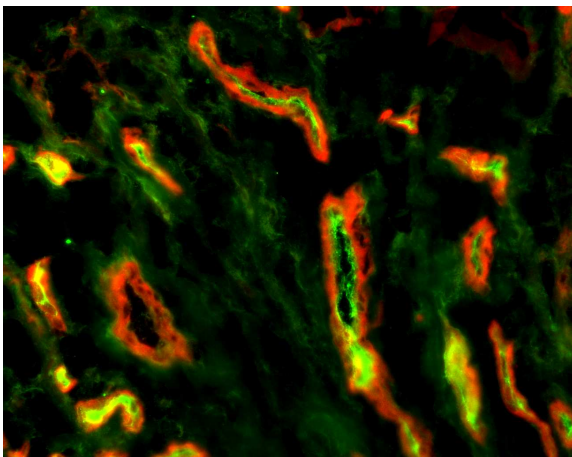


Abb. 67: Doppelfärbung von CD105 (grün) und Kollagen Typ III (rot): Deutliche lokale Assoziation zwischen CD105-positiven Zellen und Kollagen Typ III. Die immunhistochemisch hervorgehobenen Strukturen stellen am ehesten Gefäße dar. Objektivvergrößerung 20X.

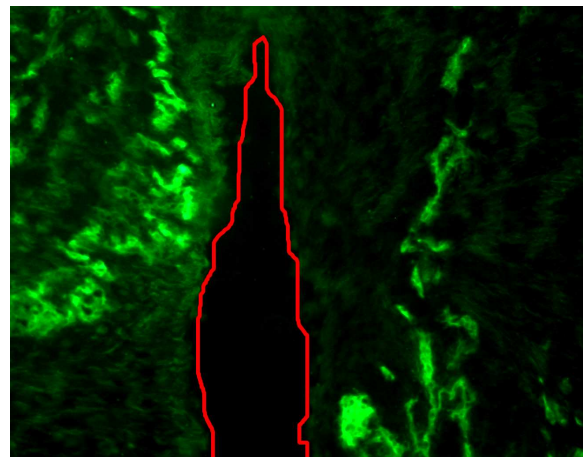


Abb. 68: Rot markiert ist der deutlich zu erkennende Riss. Zu sehen sind die zahlreichen CD105-positiven Zellgruppen in Rissnähe. Objektivvergrößerung 10X.

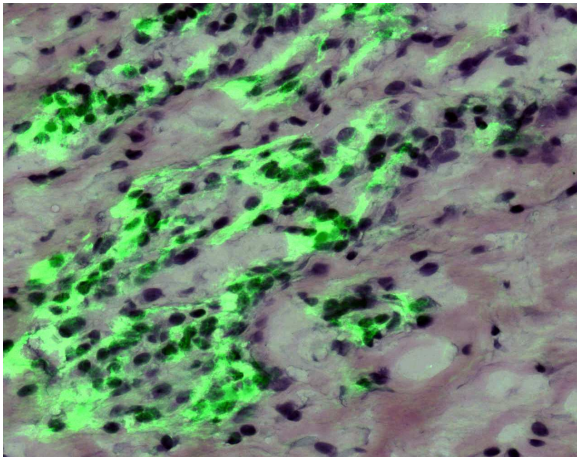


Abb. 69: Doppelfärbung für CD105 und H&E: Chondrozytäre Zellpopulation mit überwiegend positiver Anfärbung für CD105. Objektivergrößerung 20X.

Zwei Präparate enthielten CD73-positive Zellen, die jedoch nicht gleichzeitig CD105-positiv waren (Abb. 70).

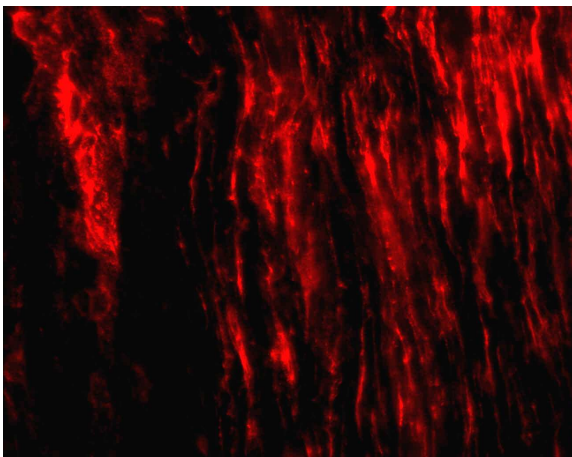


Abb. 70: Anfärbung von CD73: CD73-positive Zellen ohne Assoziation mit CD105-positiven Zellen. Zu beachten die eher zytoplasmatische Lage der CD73-positiven Zellen (dunkle Aussparungen entsprechen den Zellkernen). Objektivergrößerung 40X.

Ein weiteres Präparat zeichnete sich sowohl durch CD90- als auch CD166-positive Zellen aus (Abb. 71, 72). Es konnten keine Zellen nachgewiesen werden, die sich mit beiden Markern anfärben ließen. Es bestand ebenfalls kein Zusammenhang zu den CD105-positiven Zellen. Auffällig war bei den CD166-positiven Zellen, dass diese lediglich in der Nähe des Risses

vorkamen. Die CD90-positiven Zellen zeichneten sich durch ein eher gruppiertes Auftreten aus.

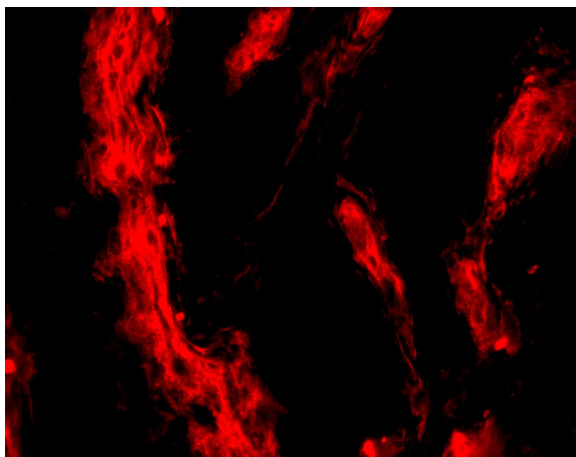


Abb. 71: CD90-Anfärbung: Organisation von CD90-positiven Zellgruppen (die dunklen Aussparungen entsprechen den Zellkernen). Objektivvergrößerung 40X

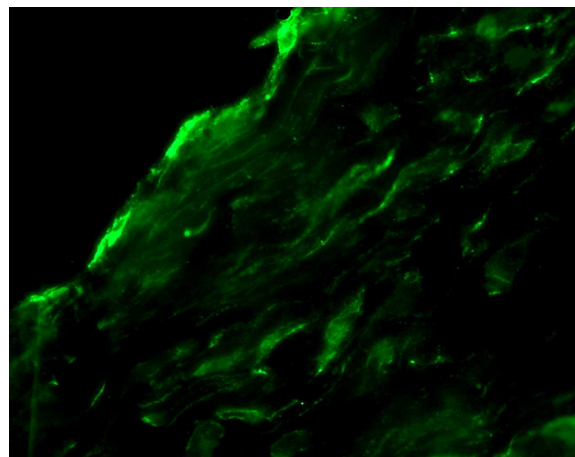


Abb. 72: CD166-Anfärbung: CD166-positive Zellen in unmittelbarer Umgebung des Risses. Objektivvergrößerung 40X.

### 9.4.3. Untersuchung auf das Vorhandensein von Knorpel-Vorläuferzellen

#### 9.4.3.1. Immunhistologische Auswertung der „gesunden“ Sehne der Vergleichsgruppe

Als einer der wichtigen Transkriptionsfaktoren in der Knorpelzellentwicklung gilt das Sox9, das unter anderem für die Kollagen Typ II-Expressionsinduktion verantwortlich ist. In der gesunden Sehne fand sich in der Region I keine Sox9-Anfärbung. Die Region II zeigte in drei Präparaten vereinzelt Sox9-positive Zellen. Sox9 war in diesen Zellen fast ausschließlich im Zytoplasma vorhanden (Abb. 73, 74). Sowohl die Form der Zellkörper als auch der Zellkerne der Sox9-positiven Zellen ließen darauf schließen, dass es sich hier am ehesten um Tenozyten handelte. In der Region III war in distaler Richtung eine Zunahme der Sox9-positiven Zellen zu beobachten, so dass am Knochenansatz selbst die Sehne fast ausschließlich aus Sox9-positiven Zellen bestand (Abb. 75). Die Morphologie des Zellkörpers als auch des Zellkerns erinnerte hier an einen chondrozytenähnlichen Phänotyp. Eine zusätzliche Färbung der Sox9-positiven Schnitte mit H&E zeigte, dass distal in der Region III die chondrozytären Zellen



überwiegend Sox9-positiv waren (Abb. 76). Auch hier fand sich Sox9 mehr im Zytoplasma lokalisiert als im Zellkern.

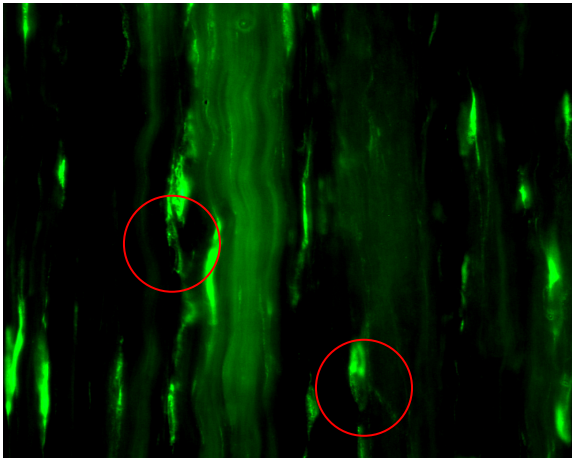


Abb. 73: Sox9-Anfärbung in der Region II: Rot markiert sind exemplarisch Zellabschnitte, in denen sich kein Sox9 fand und die, wie sich im Vergleich mit Abb. 74 zeigte, den Zellkern darstellten. Objektivergrößerung 40X.

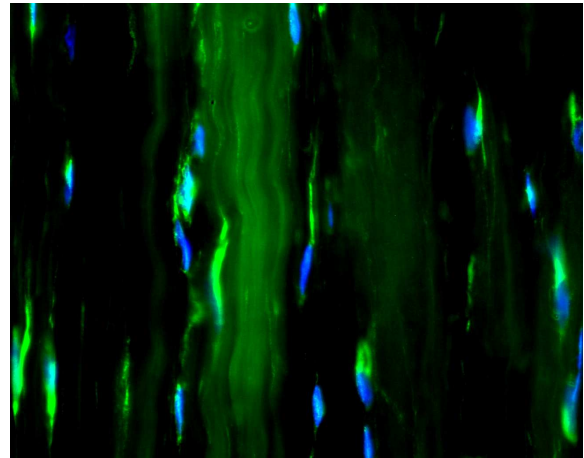


Abb. 74: Doppelfärbung für Sox9 und den Zellkernmarker DAPI an derselben Stelle wie in Abb. 73: Deutlich zu erkennen ist, dass die in Abb. 73 dargestellten Zellabschnitte ohne Zellkern-Anfärbung den Zellkernen entsprachen. Objektivergrößerung 40X.

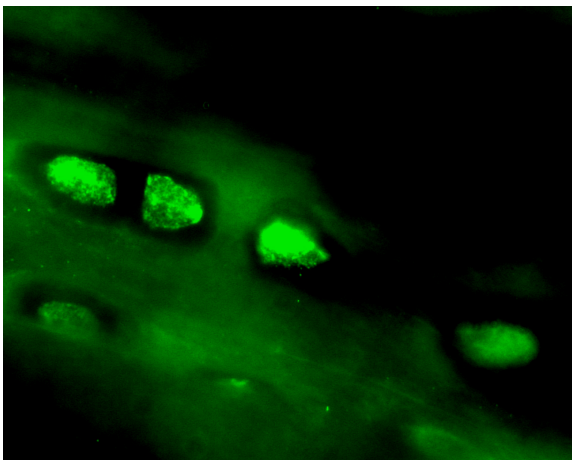


Abb. 75: Sox9-Anfärbung in der Region III: Sox9-positive Zellen mit chondrozytärem Phänotyp. Objektivergrößerung 100X.

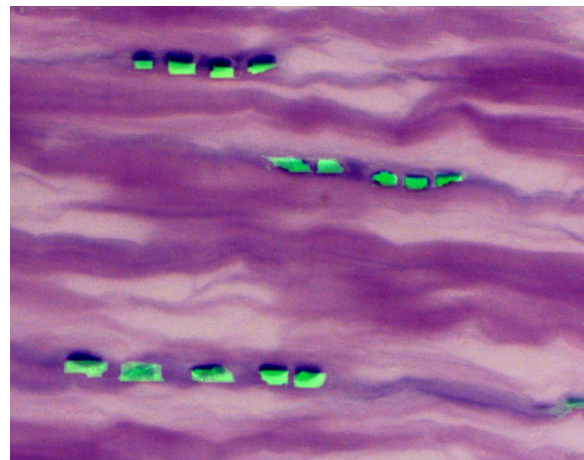


Abb. 76: Doppelfärbung für Sox9 und H&E in der Region III: Nachweis von perlschnurartig angeordneten Sox9-positiven Zellen. Objektivergrößerung 40X.

Ein Vergleich zwischen Folgeschnitten zeigte im Sehnenansatzbereich ein gehäuftes gemeinsames Auftreten von Sox9-positiven chondrozytären Zellen mit dem Vorhandensein von Kollagen Typ II.

#### 9.4.3.2. Immunhistologische Auswertung der Operationspräparate

Sox9 ließ sich in allen Sehnenpräparaten nachweisen. Auch hier waren sowohl Zellen mit einem schmalen Zellkörper, die am ehesten Tenozyten entsprachen, als auch die chondrozytenartigen Zellen Sox9-positiv (Abb. 77, 78). Ein zusätzliches Färben der Sox9-positiven Schnitte mit H&E bestätigte dies (Abb. 79).

Des Weiteren war zu beobachten, dass vor allem in den schollig degenerierten Sehnenabschnitten bei fast allen Zellen eine Sox9-Anfärbung gelang (Abb. 80). Bei der genaueren Analyse zeigte sich, dass in den Operationspräparaten Sox9 häufiger als in den Präparaten der Vergleichsgruppe auch im Zellkern lokalisiert war (Abb. 77, 78).

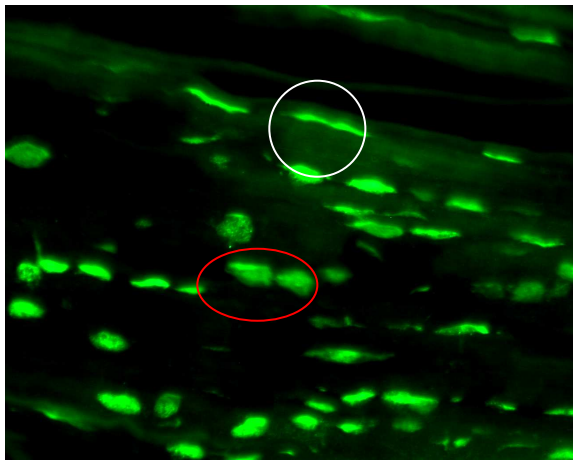


Abb. 77: Sox9-Anfärbung: Weiß hervorgehoben sind die schmalen Zellen (Tenozyten). Rot hervorgehoben sind die chondrozytären Zellen. Objektivvergrößerung 40X.

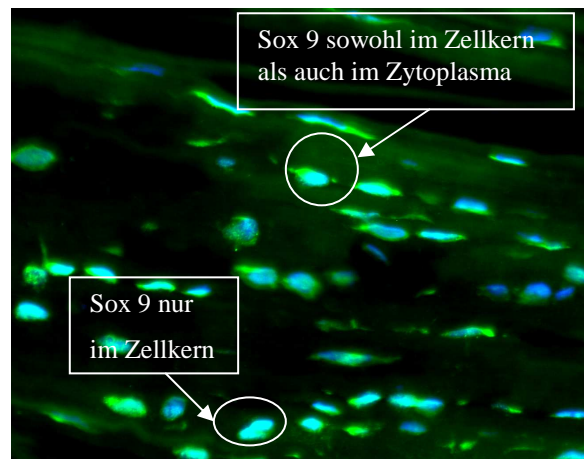


Abb. 78: Doppelfärbung für Sox9 und Zellkerne (DAPI) an derselben Stelle wie in Abb. 77: Deutlich zu erkennen ist die unterschiedliche Verteilung der Sox9-Anfärbung zwischen Zellkern und Zytoplasma Objektivvergrößerung 40X.

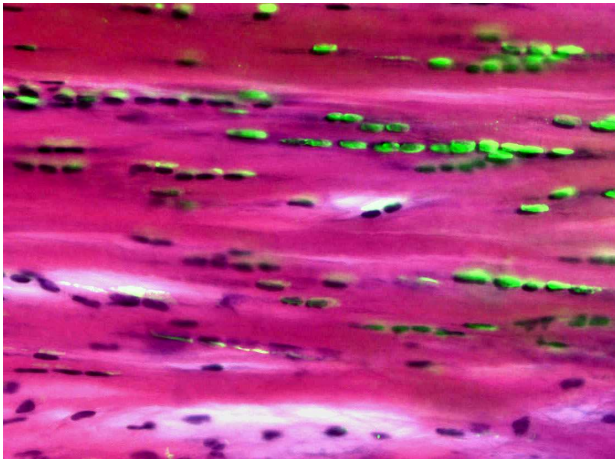


Abb. 79: Doppelfärbung für Sox9 und H&E: Die perl-schnurartig angeordneten Zellen sind Sox9-positiv. Objektivergrößerung 20X.

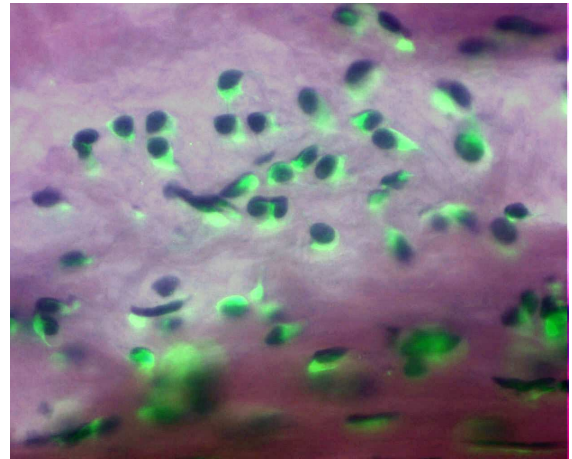


Abb. 80: Doppelfärbung für Sox9 und H&E: In schollig degenerierten Sehnenabschnitten liegen ungeordnete Zellen, die überwiegend Sox9-positiv sind. Objektivergrößerung 40X.

Durch Doppelfärbungen mit Sox9 und Kollagen Typ II konnte nachgewiesen werden, dass Sox9-positive Zellen in der Sehne nicht mit der Anfärbung von Kollagen Typ II assoziiert waren. Es fanden sich Abschnitte mit Sox9-positiven Zellen, die sich nicht für Kollagen Typ II anfärben ließen (Abb.81, 82).

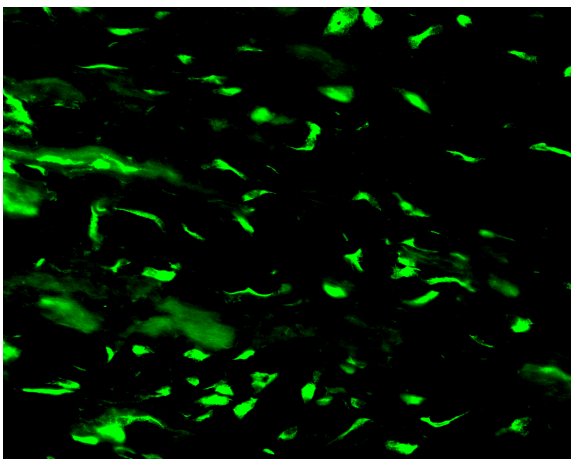


Abb. 81: Sox9 Anfärbung: Objektivergrößerung 20X.

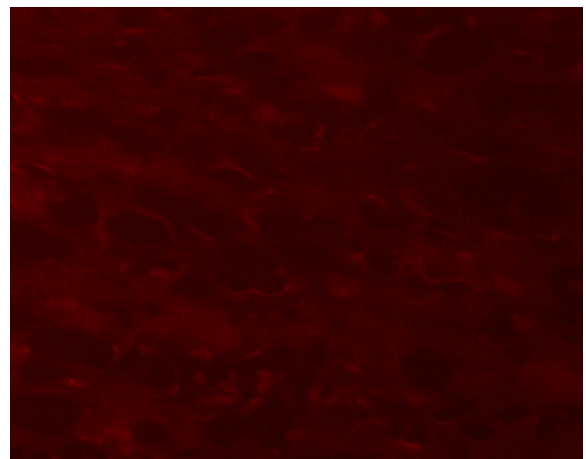


Abb. 82: Kollagen Typ II-Anfärbung in einem Folgeschnitt von Abb. 81: Es ist kein Kollagen Typ II nachweisbar. Objektivergrößerung 20X.

## 10. Diskussion

Der Pes planovalgus resultiert prinzipiell aus einem Ungleichgewicht zwischen Belastung und den statischen sowie dynamischen Stabilisatoren der Längswölbung. Van Boerum und Sangeorzan (2003) diskutierten ätiologisch die Tibialis-posterior-Sehnendysfunktion sowie eine extreme Anspannung des M. triceps surae, eine Insuffizienz des Lig. calcaneonaviculare plantare („Spring-Ligament“), der Plantaraponeurose sowie zusätzlicher plantarer Stabilisatoren. Klinische Studien haben ergänzend den ungünstigen Einfluss des Übergewichtes auf die Entstehung des Pes planovalgus belegt (Fuhrmann et al. 2005).

Auch wenn die Tibialis-posterior-Sehnendysfunktion nicht als alleinige Ursache der Knickplattfußentstehung angesehen wird, ist sie doch nach der aktuellen Literatur als wesentlicher pathogenetischer Faktor anzusehen (Thordarson et al. 1995, Yeap et al. 2001, Van Boerum und Sangeorzan 2003). Fällt die stabilisierende Funktion der Sehne auf das Talonavikulargelenk weg, wird eine allmähliche Subluxation der „Coxa pedis“ eingeleitet, die nachfolgend zu einer Dekompensation des Rückfußes mit valgischer Einstellung und Abduktion des Mittelfußes führen kann.

Histologisch wird sowohl eine Entzündung (Kettelkamp und Alexander 1969) als auch ein chronisch degenerativer nicht-entzündlicher Prozess (Mosier et al. 1999) als grundlegende Pathomechanismen für die „Dysfunktion“ der Muskel-Sehnen-Einheit diskutiert. Hinzu kommen ätiologisch eine Zone der Hypovaskularisation in der Regio retromalleolaris (Frey et al. 1990), eine Änderung der Kollagenzusammensetzung (Goncalves-Neto et al. 2002) sowie anatomische Varianten wie das Vorhandensein eines akzessorischen Os naviculare im Ansatzbereich der Sehne (Moriggl et al. 2003). Keine der bisherigen Studien konnte den genauen Pathomechanismus definieren, so dass von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen werden muss. Nur wenige Studien basieren auf einer vergleichenden Untersuchung der krankhaft veränderten mit der gesunde Sehne (Kannus und Jozsa 1991, Mosier et al. 1998, Goncalves-Neto et al. 2002).

Dieser Tatbestand wurde zum Anlass genommen, in der vorliegenden Arbeit sowohl „gesunde“ Sehnen als auch Operationspräparate der Tibialis-posterior-Sehne bei Pes planovalgus auf spezifische Kriterien und vor allem eine qualitative Veränderung der Gewebeeigenschaften hin zu untersuchen sowie die Ergebnisse der aktuellen Literatur gegenüber zu stellen.



### 10.1. Histologischer Aufbau

Die Postikussehne ändert im Verlauf um den Innenknöchel ihren strukturellen Aufbau. Bis zum Innenknöchel zeigt sie den typischen Aufbau einer Zugsehne (Petersen et al. 2004). Bei ihrem weiteren Verlauf um den Innenknöchel, der als Hypomochlium dient, ändert sie ihre Richtung und zeigt in diesem Bereich die Kriterien einer Gleitsehne (Ploetz 1938, Petersen et al. 2004). Als gleitsehnentypisches Charakteristikum finden sich in die Kollagenfasern eingelagerte chondrozytenähnliche Zellen, die sich innenknöchelnah am häufigsten darstellen. In der Literatur wird dieser Sehnenabschnitt als Faserknorpel beschrieben (Ploetz 1938, Milz et al. 1998, Moriggl et al. 2003, Petersen et al. 2004, Pufe et al. 2005). Des Weiteren ist in der Regio retromalleolaris nur ein spärlich ausgeprägtes Endo- & Peritendineum vorhanden (Petersen et al. 2004). Die Sehne erscheint an dieser Stelle hypovaskularisiert (Petersen et al. 2004). Frey et al. (1990) stellten die Hypovaskularisation mittels Injektion eines India-Tinten-Gelatine-Mix in 28 Präparaten dar. Inframalleolär beschrieben Mosier et al. (1999) eine Chondrometaplasie innerhalb der Sehne. Petersen et al. (2004) beschränkten die Faserknorpelzone auf die Regio retromalleolaris und bezeichneten die distale Sehne wieder als typische Zugsehne mit einem gut vaskularisierten Peritendineum und einem dichten Gewebe, das aus Kollagenfasern mit eingelagerten Tenozyten besteht. Die Sehne zeigt hier durch ihre fächerförmige Aufteilung in histologischen Schnitten sowohl längs- als auch quer angeschnittene Fasern.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen in der H&E-Färbung ähnliche Befunde auf. Lediglich die von Petersen et al. (2004) beschriebene typische Zugsehnenstruktur im inframalleolären Abschnitt konnte nicht bestätigt werden. In diesem Sehnenabschnitt fand sich übereinstimmend eine Zunahme der chondrozytenähnlichen Zellen. In der Literatur werden Knorpelzellen im Sehnenansatzbereich beschrieben, die dazu dienen sollen, die aus der Längsdehnung resultierende Querschnittsverminderung der Sehne einzuschränken (Rauber und Kopsch 1987, Rüther 1999). Bezogen auf die Postikussehne scheinen die inframalleolär auftretenden chondrozytären Zellen auch hier eine die Sehne stabilisierende Funktion zu haben.

Die Operationspräparate zeichneten sich im Vergleich zu den „gesunden“ Sehnen durch eine qualitative Zellzahlvermehrung sowie eine Hypervaskularisation und Auflösung der geordneten Sehnenstruktur aus. Diese Befunde korrelieren mit den Ergebnissen der Studien von Mo-

sier (1999) und Pufe (2005). Auffallend war der bei der Hälfte der Präparate festgestellte Rückgang der chondrozytären Zellen sowohl im Bereich der Regio malleolaris als auch inframalleolär. Auf die genaue Phänotyp-Charakterisierung dieser Zellen soll weiter unten eingegangen werden.

In der Literatur gab es einen Wandel bezüglich der unterstellten entzündlichen Komponente bei der Entstehung der Tibialis-posterior-Dysfunktion. Kettelkamp und Alexander (1969) sowie Key et al. (1953) beschrieben eine klinische Tenosynovitis als Ausgangspunkt einer entzündlichen Veränderung des Sehnengleitgewebes und wahrscheinlichste Ursache der Dysfunktion, was zunächst dazu führte, dass die frühen Stadien der Dysfunktion operativ mit einer Synovektomie behandelt wurden, um eine Progression der Sehneninsuffizienz zu verhindern. Später durchgeführte histologische Untersuchungen konnten die klinisch diagnostizierte Tenosynovitis nicht belegen, so dass Mosier et al. (1999) diese eher als eine späte Folge einer begleitenden chronischen Peritendinitis ansahen und ursächlich von einem generalisierten degenerativen Prozess ausgingen, der der Dysfunktion zugrunde liegt.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte kein allgemeiner Entzündungsprozess des Sehnen-  
gewebes bzw. Peritendineums gefunden werden. Lediglich an histologisch gesicherten Rissen innerhalb der Sehne konnte eine lokale Granulationsgewebeentwicklung als Ausdruck der  
Reparation festgestellt werden.

Makroskopisch fand sich nur in wenigen Sehnen eine komplette Ruptur. Die meisten Sehnenpräparate stellten sich, wie auch in der Literatur beschrieben wird, als elongiert und verdünnt dar (Jahss 1982). Dass sich bereits in den makroskopisch unauffälligen Sehnen auf mikroskopischem Niveau Partialrupturen abspielen, konnte in dieser Arbeit festgestellt werden. Auffallend war dabei, dass es sich nicht wie bei den meisten Sehnenrupturen um eine Degeneration des ganzen Sehnenquerschnitts handelte, sondern um einen degenerativen Prozess der in Längsrichtung dem Kollagenfaserverlauf folgte und dabei zum Teil nur einzelne Kollagenfaserbündel betraf.

## **10.2. Neovaskularisation**

Im Vergleich mit der „gesunden Sehne“ imponierte die Gefäßneubildung bei den Operationspräparaten als ein typischer Befund. Ein Großteil der im H&E-Präparat auffallenden Zellzahlvermehrungen konnte durch spezifische immunhistologische Untersuchungen als Gefäßen-

dothel identifiziert werden. Dies war vor allem in den strukturell besonders interessanten Bereichen von Partialrupturen und degenerativ veränderten Sehnenabschnitten ausgebildet. Von anderen Arbeitsgruppen wurde zunächst eine 14 mm lange hypovaskuläre Zone zwischen Malleolus medialis und Knochenansatz als Ursache für das schlechte Regenerationspotential der Postikussehne auf repetitive Mikrotraumen bei Pronation des Rückfußes angesehen (Frey et al. 1990, Mosier et al. 1998). 1999 diskutierten Mosier et al. hingegen, dass die Ischämie alleine keine mechanische Schwächung der Sehne hervorrufen könne. Sowohl die Neovaskularisation, die von vorhandenen Gefäßen ausgehen muss, als auch die Zellzahlvermehrung wurden als Hinweis auf eine ausreichende Versorgung der Sehne mit Nährstoffen und damit eine ausreichende Perfusion interpretiert (Mosier et al. 1999).

Die Gefäßneubildung wird von verschiedenen Faktoren gesteuert. Zwei der wichtigsten Komponenten stellen VEGF als Wachstumsinduktor und Endostatin als Inhibitor dar (Folkman und Klagsbrun 1987, O'Reilly et al. 1997, Neufeld et al. 1999). Pufe et al. beschrieben 2003 das Vorkommen von Endostatin innerhalb von Sehnen. Endostatin ließ sich fast ausschließlich nur in der näheren Umgebung der chondrozytären Zellen der Gleitzone von Gleitsehnen nachweisen. Dies wurde im Speziellen auch für die Postikussehne bestätigt (Pufe et al. 2005, Pufe et al. 2003b) und kann somit als Ursache der oben beschriebenen hypovaskulären Zone im Bereich des Innenknöchels der „gesunden“ Sehne postuliert werden.

Der in der vorliegenden Untersuchung beobachtete quantitative Rückgang der chondrozytären Zellen in der Postikussehne bei Pes planovalgus, könnte somit ein Grund für die verstärkte Gefäßneubildung sein.

Analog zu den Ergebnissen für den Faktor Endostatin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in der „gesunden“ Sehne kein VEGF nachweisbar war. In den Operationspräparaten fand sich im Gegensatz dazu jedoch eine deutliche VEGF-Anfärbung.

In der Literatur wurde VEGF lediglich in fetalen und degenerativ veränderten Sehnen beschrieben, wobei es zu einer erneuten VEGF-Präsenz in der degenerierten Sehne im Rahmen eines Reparaturprozesses kam (Pufe et al. 2001).

*In vitro*-Studien mit Tenozyten der Achillessehne von Ratten zeigten, dass Hypoxie und Zytokine Triggerfaktoren für die VEGF-Ausbildung darstellen (Pufe et al. 2001). Zusätzlich konnten Pufe et al. 2004 in einer Zellkulturstudie zeigen, dass eine mechanische Überbelastung in Knorpelscheiben über die Induktion von Hypoxia-Inducible Factor zum Nachweis von VEGF führt (Pufe et al. 2004).

Auf die Ergebnisse dieser Studien aufbauend, lässt sich vermuten, dass die mechanische Überbelastung bzw. repetitive Mikrotraumatisierung der Postikussehne im inframalleolären Bereich, die z.B. auf eine Hyperpronation des Rückfußes zurückzuführen ist, aufgrund der hervorgerufenen Hypoxie zu einer via VEGF hervorgerufenen Gefäßneubildung führt. Dieser Prozess scheint zunächst im Rahmen reparativer Vorgänge aufzutreten und kann bei weiter bestehender chronischer Überbelastung die degenerativen Prozesse unterstützen.

Diese Gefäßneubildung muss, wie Pufe et al. (2005) es bereits für die Achillessehne beschrieben haben, auch bei der Postikussehne als mögliche Ursache der mechanischen Schwächung der Sehne diskutiert werden. Die Auflösung der geordneten Sehnenstruktur durch die neugebildeten Gefäße kann in der Sehne einen Verlust an Stabilität bedingen. Die einwandernden Endothelzellen lösen proteolytisch die extrazelluläre Matrix auf, so dass ein Circulus vitiosus entsteht (Pufe et al. 2001). Dies korreliert mit der in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtung, dass die in den Operationspräparaten nachweisbaren neugebildeten Gefäße das umliegende Gewebe förmlich infiltrierten.

Sowohl für die Tendinitis der Achillessehne als auch für die chronische Patellartendinose konnte bereits eine Korrelation zwischen der intratendinösen Gefäßneubildung und chronischen Schmerzen gezeigt werden (Ohberg et al. 2001, Hoksud et al. 2006). Inwiefern sich dies auch für die degenerativ veränderte Postikussehne zeigen lässt, sollte in weiteren klinischen Arbeiten genauer untersucht werden, da sich hieraus vielleicht ein neuer therapeutischer Ansatz der Sehnendysfunktion (Veröden von Gefäßen) ergeben könnte.

#### 10.2.1. CD105-positive Zellen im Rahmen der Angiogeneese

In der Literatur wurde beschrieben, dass CD105 als potenter Marker der Gefäßneubildung vor allem auf neugebildeten Blutgefäßen im Rahmen von Tumorerkrankungen zu finden ist (Salvesen et al. 2003). In den vorliegenden Untersuchungen fanden sich in den Operationspräparaten deutlich mehr CD105-positive Zellen als in der „gesunden“ Vergleichsgruppe. Dies ist vermutlich der vermehrten Gefäßneubildung zuzuschreiben.

Ein direkter Vergleich zwischen dem Endothelmarker CD31 und CD105 verdeutlichte, dass CD105 quantitativ mehr Zellen markierte als CD31. Da diese Zellen, wie oben beschrieben und unter 10.3.1 diskutiert, in für Gefäße typischer Weise von Kollagen Typ III umgeben wurden, ist anzunehmen, dass sie ebenfalls einer Gefäßneubildung zugeschrieben werden können.

### 10.3. Extrazelluläre Matrix

In der Literatur wurde eine Änderung der Kollagenzusammensetzung im Vergleich von „gesunden“ und degenerierten Postikussehne beschrieben. So nahm in einer Studie von Goncalves-Neto et al. 2002 der Kollagen Typ III- und –V-Gehalt auf Kosten einer Reduktion des Kollagen Typ I-Gehaltes. Die Autoren sahen in dieser Änderung eine Ursache für die Abnahme der mechanischen Funktion der Sehne. Die Ergebnisse von Goncalves-Neto et al. basierten dabei auf rein quantitativen Untersuchungen, weshalb in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt auf die immunhistochemische Untersuchung der topografischen Lokalisation des Kollagens Typ III gelegt wurde.

Zusätzlich wurde die spezifische Funktion von Kollagen Typ VI sowohl im Rahmen der Chondrogenese als auch innerhalb von Heilungsprozessen an den unterschiedlichsten Geweben zum Anlass genommen, eine detaillierte Untersuchung der Sehne auf die topographische Lokalisation des Kollagen Typ VI durchzuführen. Auf den Kollagen Typ II-Gehalt wird im Abschnitt „Faserknorpel“ ausführlicher eingegangen.

#### 10.3.1. Kollagen Typ III

Kollagen Typ III findet sich in chronisch degenerierten Sehnen, wie der Achillessehne, in besonders hoher Konzentration in der Nähe von Rupturen (Eriksen et al. 2002). Einerseits fungiert Kollagen Typ III als Reparaturmechanismus bei Mikrotraumen, andererseits schwächt es durch seine dünnere Fibrillenstruktur und erhöhte Dehnbarkeit gleichzeitig die Sehne mechanisch (Liu et al. 1995, Eriksen et al. 2002). In der Literatur wurde weiterhin über ein verstärktes Vorkommen von Kollagen Typ III in der Umgebung von Gefäßansammlungen bei chronisch entzündlichen Sehnenscheidenerkrankungen, wie z.B. im Rahmen des Karpaltunnelsyndroms, berichtet (Hirata et al. 2004).

Die vorliegenden Untersuchungen konnten diese Beobachtung der perivaskulären Kollagen Typ III-Ausbildung auch für die Postikussehne nachweisen. Die vermehrte Kollagen Typ III-Konzentration scheint in der Postikussehne vor allem durch die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Gefäßneubildungen hervorgerufen zu werden. Als typisches Reparaturkollagen deutet Kollagen Typ III in der Umgebung der Gefäße darauf hin, dass die Gefäßneubildung zunächst im Rahmen des Reparaturprozesses stattgefunden hat (Hirata et al. 2004).

### 10.3.2. Kollagen Typ VI

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass sich Kollagen Typ VI in der „gesunden“ Tibialis-posterior-Sehne vor allem in der Region III, d.h. inframalleolär, fand. Als knorpeltypisches Kollagen geht dies mit dem in der Literatur beschriebenen Auftreten von Knorpelzellen am Knochenansatz von Sehnen einher (Knese und Biermann 1958, Becker 1979, Waggett et al. 1998, Rüther 1999, Felisbino und Carvalho 1999). Kollagen Typ VI bildet ein Netzwerk um die Knorpelzellen, deren Oberfläche reich an Proteoglykanen ist. Felisbino et al. stellten deshalb 1999 die These auf, dass Kollagen Typ VI u. a. dazu dient Interaktionen zwischen den verschiedenen Kollagentypen und Proteoglykanen zu ermöglichen.

Zusammengefasst erklärt dies die in dieser Arbeit beobachtete quantitative Zunahme von Kollagen Typ VI Richtung Knochenansatz sowie die netzartige Ausbreitung von Kollagen Typ VI innerhalb der extrazellulären Matrix.

Des Weiteren wurde in der Literatur ein verstärktes Auftreten von Kollagen Typ VI im Rahmen von Heilungsprozessen an unterschiedlichen Geweben beschrieben; als Beispiel seien hier sowohl die korneale als auch dermale Wundheilung angeführt (Oono et al. 1993, Murata et al. 1990). Dies spiegelt sich auch in der Postikussehne im Rahmen der vermehrten Präsenz von Kollagen Typ VI in Rissnähe wider.

### 10.4. Analyse der Zellen mit chondrozytärem Phänotyp

Das Vorkommen von chondrozytären Zellen als charakteristisches Merkmal in Gleitsehnen wurde in der Literatur häufig beschrieben (Pauwels 1960, Vogel et al. 1993, Benjamin et al. 1995, Koch und Tillmann 1995, Milz et al. 1998, Mosier et al. 1998, Mosier et al. 1999, Moriggl et al. 2003, Petersen et al. 2004, Pufe et al. 2005). Das Auftreten dieser Zellen wurde dabei in der Mehrzahl der Studien mit dem Vorkommen von Faserknorpel gleichgesetzt. Pauwels kausale Histomorphogenese liefert die biomechanische Erklärung hierfür: Da die Gleitsehne bei ihrem Verlauf um ein Hypomochlion noch zusätzlichen Druck- und Scherkräfte ausgesetzt wird, ist eine Kompensation dieser Kräfte durch die druckresistenteren Knorpelzellen besser möglich, als durch die auf Zugbelastung ausgerichteten Tenozyten (Pauwels 1960). Die bei direktem Vergleich zwischen Operationspräparaten und „gesunden“ Sehnen auffällige unterschiedliche Zellzahl sowie die veränderte strukturelle Verteilung der Zellen mit chondrozytärem Phänotyp, die sich als Zellpopulation in dieser Weise nur in Gleitsehnen

finden, weist darauf hin, dass diese Zellen am degenerativen Prozess beteiligt sind. Nur wenige Arbeiten haben diese Zellen speziell in der Postikussehne bisher mit immunhistologischen Markern untersucht (Petersen et al. 2004, Pufe et al. 2005).

#### 10.4.1. Faserknorpel

Der Faserknorpel in Gleitsehnen wurde zunächst als degenerative Erscheinung gewertet, aber Benjamin et al (1995), Koch und Tillmann (1995) sowie Milz et al. (1998) konnten nachweisen, dass Faserknorpel in Gleitsehnen einen physiologischen Befund darstellt.

Koch und Tillmann (1995), Petersen et al. (2004) sowie Pufe et al. (2005) identifizierten das Gewebe mittels immunhistochemischem Nachweis von Kollagen Typ II, Aggrecan, Chondroitin-4-Sulfat, Chondroitin-6-Sulfat und Keratan-Sulfat als Faserknorpel. Petersen et al. (2004) sahen dabei im Vorkommen von Faserknorpel eine lokale mechanische Schwächung der Sehne gegenüber Zugstress und postulierten damit eine potentielle Ursache für die spontane Sehnenruptur und die Postikussehnenendysfunktion. Mosier et al. (1998) beschreiben in ihrer Studie über 15 gesunde und 15 degenerativ veränderte Postikussehnen hingegen eine chondrogene Metaplasie lediglich im ossären Ansatzbereich der Sehne.

In der vorliegenden Arbeit konnte in der Gleitzone (Region II, retromalleolär) Kollagen Typ II in der „gesunden“ Sehne nicht regelmäßig nachgewiesen werden. Auch andere knorpeltypische Färbungen wie die Safranin O-Färbung, die Alcianblau-Färbung oder der immunhistochemische Nachweis von Aggrecan bestätigten dieses Ergebnis. In Proben, die in der H&E-Färbung Zellen mit chondrozytären Phänotyp aufwiesen, fanden sich ergänzend dazu meist keine Knorpelmarker. Erst Richtung Knochenansatz (Region III = inframalleolär) konnten die knorpeltypischen Marker nachgewiesen werden.

Die Operationspräparate ließen ein ähnliches Verhalten erkennen. Auch hier fand sich Kollagen Typ II lediglich in Richtung Knochenansatz, auch wenn in der H&E-Färbung chondrozytenähnliche Zellen bereits im proximalen Abschnitt nachgewiesen werden konnten.

Diese Untersuchungen zeigten zusammenfassend, dass es nur im Sehnenansatzbereich der Postikussehne zu einer physiologischen Knorpelzelleinlagerung in knorpeltypischer EZM kommt, wie dies auch in der Literatur für andere Sehnen beschrieben wurde (Rauber und Kopsch 1987, Rüther 1999).

In der Gleitzone hingegen lagen zwar Zellen vor, die im H&E-Präparat einen chondrozytären Phänotyp zeigten, die aber nicht regelmäßig auch eine knorpeltypische EZM expremierten. Eine chondrale Metaplasie mit entsprechender EZM, wie sie z. B. während des chronisch de-

generativen Prozesses bei der Rotatorenmanschettenruptur beschrieben wird (Lotz 2003), konnte hier in den Operationspräparaten nicht nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wird deshalb davon ausgegangen, dass diese Zellen lediglich einen chondrozytären Phänotyp aufzuweisen, um den in der Gleitzone zusätzlich auftretenden Scherkräften besser widerstehen zu können.

#### 10.4.2. Mesenchymale Vorläuferzellen (MSCs)

Unter Berücksichtigung des quantitativen Unterschiedes der Zellen mit chondrozytärem Phänotyp zwischen Operationspräparat und „gesunder“ Sehne sowie dem fehlenden Nachweis von knorpelspezifischen Markern, wurden weitere Untersuchungen dieser Zellen durchgeführt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Arbeitshypothese aufgestellt, dass es sich bei den Zellen mit chondrozytärem Phänotyp um mesenchymale Vorläuferzellen handelt, die innerhalb des Degenerationsprozesses ausdifferenzieren. Die Rolle von mesenchymalen Vorläuferzellen im Kontext mit einem Reparaturprozesses in pathogenen Geweben wurde bereits für die Arthritis beschrieben. Murakami et al. (2000) und (Alsalameh et al. 2004, Murakami et al. 2000) diskutierten den Einfluss von Entzündungsmediatoren auf die abnorme Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen, die sowohl zur pathogenen Kalzifizierung der Knorpelmatrix als auch zur pathogenen Bildung von Faserknorpel in arthritischem Knorpel führen soll.

Diese oben aufgestellte Arbeitshypothese konnte aber in den vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden. Es fanden sich keine Zellen, die mehr als einen der für mesenchymale Vorläuferzellen typischen Oberflächenmarker (CD73, CD90, CD105, CD166) aufwiesen. CD105 fand sich als einziger der für mesenchymale Vorläuferzellen typischen Marker deutlich verstärkt in den Operationspräparaten. Da sich kein anderer der weiteren Marker (CD73, CD90, CD166) auf diesen Zellen nachweisen ließ, ist davon auszugehen, dass diese Zellen keine Vorläuferzellen darstellen. Die wenigen, vereinzelt vorkommenden Zellen, die entweder CD73 bzw. CD90 oder CD166 positiv waren, scheinen vor dem Hintergrund der bisher in der Literatur beschriebenen Lokalisationen am ehesten Fibroblasten bzw. lymphatisches Gewebe darzustellen. Auf die Bedeutung von CD105 im Rahmen der Neovaskularisation wurde bereits unter 10.2.1 näher eingegangen.



### 10.4.3. Sox9-positive Zellen

Da sich weder regelmäßig typische Knorpelmarker noch Marker für mesenchymale Vorläuferzellen nachweisen ließen, wurde im Rahmen der genaueren Analyse der chondrozytären Zellen mit Sox9 ein Marker ausgesucht, der den Differenzierungszeitraum zwischen mesenchymaler Vorläuferzelle und enddifferenzierter Knorpelzelle darstellt (Lefebvre et al. 1997, Lefebvre et al. 2001, Asou et al. 2002).

In den vorliegenden Untersuchungen konnte in der „gesunden“ Sehne Sox9 in der Region I gar nicht, in der Region II vereinzelt und in der Region III hingegen in fast allen Zellen nachgewiesen werden. Dabei waren sowohl Tenozyten als auch chondrozytenartige Zellen positiv. Das Vorkommen in normalen Tenozyten lässt sich am ehesten mit der ubiquitären Funktion des Sox9 als Transkriptionsfaktor erklären, der neben der konzentrationsabhängigen Kollagen Typ 2A1-Induktion unter anderem auch eine wichtige Rolle in der Geschlechtsentwicklung im Rahmen der Sertolizellentwicklung, der Stammzellerhaltung im Gehirn, der Entwicklung des Magendarmtraktes, der Apoptoseinduktion bei Kolon-Karzinom sowie der Melanozytenentwicklung spielt (Bell et al. 1997, Kypriotou et al. 2003, Malki et al. 2005, Theodosiou und Tabin 2005, Cook et al. 2005, Jay et al. 2005). Legt man Pauwels kausale Histomorphogenese zugrunde, scheinen die Zellen in der ansatznahen Region III als Antwort auf die einwirkenden mechanischen Kräfte ihre Transkription für Sox9 zu steigern. Für die chondrozytären Zellen der inframalleolären Region kann dies zusammen mit der Kollagen Typ II-Anreicherung als zusätzliche Bestätigung des Vorkommens von Faserknorpel angesehen werden.

Die Operationspräparate zeigten fast ausschließlich Sox9-positive Zellen. Auffällig war hier die veränderte Lokalisation von Sox9 innerhalb der Zelle im Vergleich zur „gesunden“ Sehne. In den Operationspräparaten fand sich Sox9 im Vergleich zur „gesunden“ Sehne verstärkt im Zellkern. Im Rahmen der Geschlechtsentwicklung wurde bereits beschrieben, dass die Lokalisation von Sox9 innerhalb der Zelle mit dessen Aktivierungszustand einhergeht. In männlichen Sertolizellen wird Sox9 in den Zellkern transportiert und dort weiter expremiert. In weiblichen Keimzellen bleibt Sox9 im Zytoplasma und wird daraufhin nicht mehr expremiert (Malki et al. 2005).

## 11. Schlussfolgerung

Die bisherigen histologischen und molekularen Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei der Tibialis-posterior-Sehnendysfunktion weniger um eine chronische Entzündung als eher um einen chronisch degenerativen Prozess handelt. Ursachen werden in den verschiedensten Tatsachen wie der physiologischen lokalen Hypovaskularisation, der Ausbildung von Faserknorpel bzw. einer Änderung der Kollagenzusammensetzung gesehen. Da keine Studie bisher einen einzelnen die Degeneration verursachenden Faktor identifizieren konnte, ist am ehesten von einer multifaktoriellen Pathogenese auszugehen. Allen Studien ist gemeinsam, dass die pathogenen Veränderungen sich innerhalb der Sehne in ihrem Verlauf um den Innenknöchel und in Richtung Knochenansatz finden.

Die vorliegende Arbeit hat sich kritisch mit der aktuellen Literatur zu Ursachen der Postikus-sehnendysfunktion und Sehnendegeneration im Allgemeinen auseinandergesetzt und konnte durch den direkten Vergleich von „gesunden“ Gewebeproben mit Operationspräparaten Faktoren identifizieren, die auf eine Störung der Mikroarchitektur und Änderungen der qualitativen Gewebezusammensetzung als Kennzeichen der chronischen Degeneration hinweisen.

Ein wesentliches Ergebnis der vorliegenden Arbeit beinhaltet die Identifikation der im Rahmen des chronischen Degenerationsprozesses auftretenden Zellzahlvermehrung, die zum Großteil durch Gefäßneubildungen verursacht wurde. Es ist anzunehmen, dass mechanische Mikrotraumen der Postikussehne sowie die Hypoxie innerhalb der Sehne via HIF und damit VEGF die Neovaskularisation induzieren. Die Gefäßneubildung kann sich bei einem Fortbestehen der mechanischen Überbelastung über den für die Reparatur benötigten Rahmen hinaus verstärken und durch eine Auflösung der Sehnengrundstruktur zu einer zusätzlichen mechanischen Schwächung der Sehne führen, was diese wieder anfälliger für mechanische Belastungen macht. Zieht man nun noch sowohl die Studie von Ohberg et al. (2001) als auch die Studie von Hoksud (2006) über die positive Korrelation zwischen Neovaskularisation und Schmerzen im Rahmen der chronischen Achillestendinose bzw. Patellartendinose hinzu, ergibt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit mit der verstärkten Gefäßneubildung in der degenerierten Sehne ein interessanter Faktor, der Grundlage eines Therapiekonzepts sein könnte. Geht man davon aus, dass die bei Tibialis-posterior-Dysfunktion beklagten Beschwerden ebenfalls auf die verstärkte Neovaskularisation zurückzuführen sind, so könnte, wie es für die chronische Achillessehnentendinose bzw. chronische Patellarsehnentendinose bereits be-

schrieben wurde, die Sklerosierungstherapie einen neuen Therapieansatz darstellen. (Ohberg und Alfredson 2002, Alfredson und Ohberg 2005, Hoksud et al. 2006).

Ein weiteres wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist die Typisierung der chondrozytären Zellen. Sie stellen weder ausdifferenzierte Knorpelzellen noch mesenchymale Vorläuferzellen dar, so dass in dieser Arbeit davon ausgegangen wird, dass es sich bei ihnen am ehesten um Tenozyten handelt, die sich im Rahmen einer Anpassungsreaktion auf die zusätzlichen mechanischen Kräfte, die innerhalb einer Gleitsehne im Verlauf um ihr Hypomochlium entstehen, von ihrer Morphe her verändern und sich vergrößern. Ähnliche Veränderungen sind für die Rotatorenmanschette im Rahmen des Heilungsprozesses beschrieben (Lotz 2003). Vor diesem Hintergrund wurde zu Beginn dieser Arbeit ein analoger Prozess für die chronische Postikussehnendegeneration angenommen. Dies konnte aber nicht bestätigt werden. Es stellte sich im Gegenteil vielmehr heraus, dass die chondrozytären Zellen der Region II (retromalleolär) sowie des Überganges zur Region III (retromalleolär) bereits physiologisch vorhanden sind und keinen Faserknorpel darstellen. Innerhalb des degenerativen Prozesses kommt es zudem eher zu einer Reduktion als zu einem verstärkten Auftreten der Zellen mit Chondrozytenphänotyp.

Die Funktion der im Rahmen der Identifikation der chondrozytären Zellen nachgewiesenen Sox9-positiven Zellen ließ sich in dieser Arbeit nicht für alle Zellpopulationen klären. Die Sox9-positiven Zellen der „gesunden“ Sehne in einer Kollagen Typ-II-haltigen extrazellulären Matrix am Knochenansatz bestätigen die Vermutung des Auftretens von Faserknorpel am Übergang von der Sehne zum Knochen. Durch das Vorhandensein von Faserknorpel nähern sich die auf Zug ausgerichteten Eigenschaften der Sehne den druckadaptierten Eigenschaften des Knochens an. Sowohl für das Vorhandensein von Sox9 in den durch ihren Phänotyp als Tenozyten charakterisierten Zellen als auch für die Beobachtung, dass sich in den Operationspräparaten Sox9 im Vergleich zur „gesunden“ Sehne vermehrt im Zellkern findet, konnte in der vorliegenden Arbeit keine Erklärung gefunden werden. Was genau durch Sox9 induziert wird bzw. ob die unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation von Sox9 auch in der Sehne einen veränderten Aktivierungszustand darstellt, sollte bezüglich der molekularbiologischen Ursachenforschung des Degenerationsprozesses in folgenden Zellkulturstudien näher untersucht werden.

Ein weiteres Ergebnis der vorliegenden Arbeit, das in der klinischen Behandlung berücksichtigt werden sollte, ist die Tatsache, dass auch in makroskopisch noch intakten Sehnen bereits degenerierte Abschnitte in Längsrichtung der Kollagenfasern zu finden sind. Hier deutet sich an, dass der degenerative Prozess innerhalb der Längsrichtung der Sehne stattfindet, so dass von den operativen Maßnahmen der Sehnenraffung als Therapie der Dysfunktion Abstand genommen werden sollte, da davon ausgegangen werden kann, dass die geraffte Sehne bereits degenerierte Abschnitte enthält und in absehbarer Zeit erneut insuffizient wird.

## 12. Literaturverzeichnis

- Aikawa M, Sivam PN, Kuro-o M, Kimura K, Nakahara K, Takewaki S, Ueda M, Yamaguchi H, Yazaki Y, Periasamy M, et al. 1993. Human smooth muscle myosin heavy chain isoforms as molecular markers for vascular development and atherosclerosis. *Circ Res*, 73 (6):1000-1012.
- Alfredson H, Ohberg L. 2005. Neovascularisation in chronic painful patellar tendinosis--promising results after sclerosing neovessels outside the tendon challenge the need for surgery. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 13 (2):74-80.
- Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. 2004. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 50 (5):1522-1532.
- Arai F, Ohneda O, Miyamoto T, Zhang XQ, Suda T. 2002. Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *J Exp Med*, 195 (12):1549-1563.
- Argentaro A, Sim H, Kelly S, Preiss S, Clayton A, Jans DA, Harley VR. 2003. A SOX9 defect of calmodulin-dependent nuclear import in campomelic dysplasia/autosomal sex reversal. *J Biol Chem*, 278 (36):33839-33847.
- Asou Y, Nifuji A, Tsuji K, Shinomiya K, Olson EN, Koopman P, Noda M. 2002. Coordinated expression of scleraxis and Sox9 genes during embryonic development of tendons and cartilage. *J Orthop Res*, 20 (4):827-833.
- Barry F, Boynton R, Murphy M, Haynesworth S, Zaia J. 2001. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 289 (2):519-524.
- Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. 1999. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun*, 265 (1):134-139.
- Bayes-Genis A, Roura S, Soler-Botija C, Farre J, Hove-Madsen L, Llach A, Cinca J. 2005. Identification of cardiomyogenic lineage markers in untreated human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Transplant Proc*, 37 (9):4077-4079.
- Becker W. 1979. Elektronenmikroskopische Untersuchung der Insertion von Sehnen am Knochen. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery (Historical Archive)*, 69 (4):315-329.
- Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP, Cheah KS. 1997. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet*, 16 (2):174-178.
- Benjamin M, Qin S, JR. R. 1995. Fibrocartilage associated with human tendons and their pulleys. *J Anat*, 187 (PT3):625-633.
- Benya PD, Padilla SR, Nimni ME. 1978. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell*, 15 (4):1313-1321.
- Bowen MA, Patel DD, Li X, Modrell B, Malacko AR, Wang WC, Marquardt H, Neubauer M, Pesando JM, Francke U, et al. 1995. Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J Exp Med*, 181 (6):2213-2220.
- Bray DF, Bray RC, Frank CB. 1993. Ultrastructural immunolocalization of type-VI collagen and chondroitin sulphate in ligament. *J Orthop Res*, 11 (5):677-685.
- Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, Barry FP. 1998. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell ad-

- hesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res*, 13 (4):655-663.
- Bruns RR, Press W, Engvall E, Timpl R, Gross J. 1986. Type VI collagen in extracellular, 100-nm periodic filaments and fibrils: identification by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol*, 103 (2):393-404.
- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 98 (8):2396-2402.
- Cheung M, Briscoe J. 2003. Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9. *Development*, 130 (23):5681-5693.
- Cook AL, Smith AG, Smit DJ, Leonard JH, Sturm RA. 2005. Co-expression of SOX9 and SOX10 during melanocytic differentiation in vitro. *Exp Cell Res*, 308 (1):222-235.
- Degen WG, van Kempen LC, Gijzen EG, van Groningen JJ, van Kooyk Y, Bloemers HP, Swart GW. 1998. MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human melanoma cell lines, is identical to ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule). *Am J Pathol*, 152 (3):805-813.
- Deutzmann R, Bruckner-Tuderman L, Bruckner P. 2003. Binde- und Stützgewebe. In: Löffler G, Petrides PE, Hrsg. *Biochemie und Pathobiochemie*. 8te Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer., 754-787.
- Enomoto H, Inoki I, Komiya K, Shiomi T, Ikeda E, Obata K, Matsumoto H, Toyama Y, Okada Y. 2003. Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol*, 162 (1):171-181.
- Eriksen HA, Pajala A, Leppilahti J, Risteli J. 2002. Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon. *J Orthop Res*, 20 (6):1352-1357.
- Felisbino SL, Carvalho HF. 1999. Identification and distribution of type VI collagen in tendon fibrocartilages. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 31 (2):187-195.
- Fibbe WE. 2002. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis*, 61 Suppl 2:ii29-31.
- Fickert S, Fiedler J, Brenner RE. 2003. Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting. *Osteoarthritis Cartilage*, 11 (11):790-800.
- Fickert S, Fiedler J, Brenner RE. 2004. Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. *Arthritis Res Ther*, 6 (5):R422-432.
- Folkman J, Klagsbrun M. 1987. Angiogenic factors. *Science*, 235 (4787):442-447.
- Frey C, Shereff M, Greenidge N. 1990. Vascularity of the posterior tibial tendon. *J Bone Joint Surg Am*, 72 (6):884-888.
- Fuhrmann RA, Trommer T, Venbrocks RA. 2005. [The acquired buckling-flatfoot. A foot deformity due to obesity?]. *Orthopade*, 34 (7):682-689.
- Gasca S, Canizares J, De Santa Barbara P, Mejean C, Poulat F, Berta P, Boizet-Bonhoure B. 2002. A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (17):11199-11204.
- Gelse K, Poschl E, Aigner T. 2003. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*, 55 (12):1531-1546.
- Goncalves-Neto J, Witzel SS, Teodoro WR, Carvalho-Junior AE, Fernandes TD, Yoshinari HH. 2002. Changes in collagen matrix composition in human posterior tibial tendon dysfunction. *Joint Bone Spine*, 69 (2):189-194.
- Heinzeller T. 2001. Binde- und Stützgewebe. In: Hrsg. *Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg*. 1te Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 77.

- Hirata H, Nagakura T, Tsujii M, Morita A, Fujisawa K, Uchida A. 2004. The relationship of VEGF and PGE2 expression to extracellular matrix remodelling of the tenosynovium in the carpal tunnel syndrome. *J Pathol*, 204 (5):605-612.
- Hoksrud A, Ohberg L, Alfredson H, Bahr R. 2006. Ultrasound-Guided Sclerosis of Neovessels in Painful Chronic Patellar Tendinopathy: A Randomized Controlled Trial. *Am J Sports Med*,
- Holmes GB, Jr., Mann RA. 1992. Possible epidemiological factors associated with rupture of the posterior tibial tendon. *Foot Ankle*, 13 (2):70-79.
- Huth JR, Bewley CA, Nissen MS, Evans JN, Reeves R, Gronenborn AM, Clore GM. 1997. The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat Struct Biol*, 4 (8):657-665.
- Jahss MH. 1982. Spontaneous rupture of the tibialis posterior tendon: clinical findings, tenographic studies, and a new technique of repair. *Foot Ankle*, 3 (3):158-166.
- Jay P, Berta P, Blache P. 2005. Expression of the carcinoembryonic antigen gene is inhibited by SOX9 in human colon carcinoma cells. *Cancer Res*, 65 (6):2193-2198.
- Johnson KA, Strom DE. 1989. Tibialis posterior tendon dysfunction. *Clin Orthop Relat Res*, (239):196-206.
- Kannus P, Jozsa L. 1991. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg Am*, 73 (10):1507-1525.
- Keene DR, Engvall E, Glanville RW. 1988. Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network. *J Cell Biol*, 107 (5):1995-2006.
- Kettlkamp DB, Alexander HH. 1969. Spontaneous rupture of the posterior tibial tendon. *J Bone Joint Surg Am*, 51 (4):759-764.
- Kitaoka HB, Patzer GL. 1997. Subtalar arthrodesis for posterior tibial tendon dysfunction and pes planus. *Clin Orthop Relat Res*, (345):187-194.
- Kitaoka HB, Luo ZP, An KN. 1997. Subtalar arthrodesis versus flexor digitorum longus tendon transfer for severe flatfoot deformity: an in vitro biomechanical analysis. *Foot Ankle Int*, 18 (11):710-715.
- Knese KH, Biermann H. 1958. [Osteogenesis in tendon and ligament insertions in the area of the original chondral apophyses.]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 49 (2):142-187.
- Koch S, Tillmann B. 1995. The distal tendon of biceps brachii. *Ann Anat*, 177:467-474.
- Kumar P, Wang JM, Bernabeu C. 1996. CD 105 and angiogenesis. *J Pathol*, 178 (4):363-366.
- Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, Bundred N. 1999. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res*, 59 (4):856-861.
- Kummer, B. 1980. Bau und Funktion des Bewegungsapparates. In: Witt, A. Retting H., Schlegel K., Hackenbroch, M., Hupfhauer, W. Hrsg. Orthopädie in Praxis und Klinik. Band I Allgemeine Orthopädie. Stuttgart: Thieme.
- Kwok C, Weller PA, Guioli S, Foster JW, Mansour S, Zuffardi O, Punnett HH, Dominguez-Steglich MA, Brook JD, Young ID, et al. 1995. Mutations in SOX9, the gene responsible for Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal. *Am J Hum Genet*, 57 (5):1028-1036.
- Kypriotou M, Fossard-Demoor M, Chadjichristos C, Ghayor C, de Crombrughe B, Pujol JP, Galera P. 2003. SOX9 exerts a bifunctional effect on type II collagen gene (COL2A1) expression in chondrocytes depending on the differentiation state. *DNA Cell Biol*, 22 (2):119-129.
- Lefebvre V, Behringer RR, de Crombrughe B. 2001. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis Cartilage*, 9 Suppl A:S69-75.

- Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. 1997. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol*, 17 (4):2336-2346.
- Leonhardt H. 1985. Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. 3te Aufl. Stuttgart, New York: Thieme.
- Liu SH, Yang RS, al-Shaikh R, Lane JM. 1995. Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Clin Orthop Relat Res*, (318):265-278.
- Lotz AS. 2003. Modulation des Einwachsverhaltens kortikal reinserterter Sehnen und Ligamente durch Wachstumsfaktoren; Veränderungen der Supraspinatussehne im Zuge eines akuten Traumas [Dr.]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Malki S, Berta P, Poulat F, Boizet-Bonhoure B. 2005. Cytoplasmic retention of the sex-determining factor SOX9 via the microtubule network. *Exp Cell Res*, 309 (2):468-475.
- Mansilla E, Marin GH, Drago H, Sturla F, Salas E, Gardiner C, Bossi S, Lamonega R, Guzman A, Nunez A, Gil MA, Piccinelli G, Ibar R, Soratti C. 2006. Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant Proc*, 38 (3):967-969.
- Mansour S, Hall CM, Pembrey ME, Young ID. 1995. A clinical and genetic study of campomelic dysplasia. *J Med Genet*, 32 (6):415-420.
- Miehe B. 1998. Elastischer und Faserknorpel. In: Linß W, Fanghänel J, Hrsg. Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie. 1te Aufl. Berlin, New York: de Gruyter, 61.
- Milz S, McNeilly C, Putz R, Ralphs JR, Benjamin M. 1998. Fibrocartilages in the extensor tendons of the interphalangeal joints of human toes. *Anat Rec*, 252 (2):264-270.
- Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet*, 14 (1):62-68.
- Moriggl B, Kumai T, Milz S, Benjamin M. 2003. The structure and histopathology of the "enthesis organ" at the navicular insertion of the tendon of tibialis posterior. *J Rheumatol*, 30 (3):508-517.
- Mosier SM, Pomeroy G, Manoli A, 2nd. 1999. Pathoanatomy and etiology of posterior tibial tendon dysfunction. *Clin Orthop Relat Res*, (365):12-22.
- Mosier SM, Lucas DR, Pomeroy G, Manoli A, 2nd. 1998. Pathology of the posterior tibial tendon in posterior tibial tendon insufficiency. *Foot Ankle Int*, 19 (8):520-524.
- Mueller TJ. 1991. Acquired flatfoot secondary to tibialis posterior dysfunction: biomechanical aspects. *J Foot Surg*, 30 (1):2-11.
- Murakami S, Lefebvre V, de Crombrughe B. 2000. Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*, 275 (5):3687-3692.
- Murata Y, Yoshioka H, Kitaoka M, Iyama K, Okamura R, Usuku G. 1990. Type VI collagen in healing rabbit corneal wounds. *Ophthalmic Res*, 22 (3):144-151.
- Murphy PG, Loitz BJ, Frank CB, Hart DA. 1994. Influence of exogenous growth factors on the synthesis and secretion of collagen types I and III by explants of normal and healing rabbit ligaments. *Biochem Cell Biol*, 72 (9-10):403-409.
- Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP, Caplan AI. 1991. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res*, 195 (2):492-503.
- Nathanson MA. 1985. Bone matrix-directed chondrogenesis of muscle in vitro. *Clin Orthop Relat Res*, (200):142-158.



- Nelissen JM, Torensma R, Pluyter M, Adema GJ, Raymakers RA, van Kooyk Y, Figdor CG. 2000. Molecular analysis of the hematopoiesis supporting osteoblastic cell line U2-OS. *Exp Hematol*, 28 (4):422-432.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J*, 13 (1):9-22.
- Ng LJ, Wheatley S, Muscat GE, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E, Bell DM, Tam PP, Cheah KS, Koopman P. 1997. SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol*, 183 (1):108-121.
- Ohberg L, Alfredson H. 2002. Ultrasound guided sclerosis of neovessels in painful chronic Achilles tendinosis: pilot study of a new treatment. *Br J Sports Med*, 36 (3):173-175; discussion 176-177.
- Ohberg L, Lorentzon R, Alfredson H. 2001. Neovascularisation in Achilles tendons with painful tendinosis but not in normal tendons: an ultrasonographic investigation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 9 (4):233-238.
- Ono M, Kuwano M. 1997. [Angiogenesis and its inhibitors]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 24 (11):1585-1593.
- Oono T, Specks U, Eckes B, Majewski S, Hunzelmann N, Timpl R, Krieg T. 1993. Expression of type VI collagen mRNA during wound healing. *J Invest Dermatol*, 100 (3):329-334.
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88 (2):277-285.
- Owens GK. 1998. Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation. *Acta Physiol Scand*, 164 (4):623-635.
- Patel DD, Wee SF, Whichard LP, Bowen MA, Pesando JM, Aruffo A, Haynes BF. 1995. Identification and characterization of a 100-kD ligand for CD6 on human thymic epithelial cells. *J Exp Med*, 181 (4):1563-1568.
- Pauwels F. 1960. Eine neue Theorie über den Einfluß mechanischer Reize auf die Differenzierung der Stützgewebe. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 121:478-515.
- Petersen W, Hohmann G, Pufe T, Tsokos M, Zantop T, Paulsen F, Tillmann B. 2004. Structure of the human tibialis posterior tendon. *Arch Orthop Trauma Surg*, 124 (4):237-242.
- Ploetz E. 1938. Funktioneller Bau und funktionelle Anpassung der Gleitsehnen. *Z Orthop*, 67:212-234.
- Pschyrembel. 1998. Kampomelie. In: Hildebrandt H, Hrsg. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 258te Aufl. Berlin: de Gruyter, 793.
- Pufe T, Petersen W, Tillmann B, Mentlein R. 2001. The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor is expressed in foetal and ruptured tendons. *Virchows Arch*, 439 (4):579-585.
- Pufe T, Petersen WJ, Mentlein R, Tillmann BN. 2005. The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease. *Scand J Med Sci Sports*, 15 (4):211-222.
- Pufe T, Paulsen F, Petersen W, Mentlein R, Tsokos M. 2003a. The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed in chronic sacral pressure ulcers. *J Pathol*, 200 (1):130-136.
- Pufe T, Petersen W, Kurz B, Tsokos M, Tillmann B, Mentlein R. 2003b. Mechanical factors influence the expression of endostatin--an inhibitor of angiogenesis--in tendons. *J Orthop Res*, 21 (4):610-616.

- Pufe T, Lemke A, Kurz B, Petersen W, Tillmann B, Grodzinsky AJ, Mentlein R. 2004. Mechanical overload induces VEGF in cartilage discs via hypoxia-inducible factor. *Am J Pathol*, 164 (1):185-192.
- Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. 2006. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, 54 (4):385-395.
- Rahkonen O, Savontaus M, Abdelwahid E, Vuorio E, Jokinen E. 2003. Expression patterns of cartilage collagens and Sox9 during mouse heart development. *Histochem Cell Biol*, 120 (2):103-110.
- Rauber, Kopsch. 1987. Quergestreifte Skelettmuskulatur. In: Leohardt H, Tillmann B, Töndury G, Zilles K, Hrsg. *Anatomie des Menschen Bd I Bewegungsapparat*. 1te Aufl. Stuttgart, New York: Thieme, 148-155.
- Rauber, Kopsch. 1998. Band I Bewegungsapparat. In: Leohardt H, Tillmann B, Töndury G, Zilles K, Hrsg. *Anatomie des Menschen, Lehrbuch und Atlas*. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme,
- Roberts AB, Sporn MB. 1989. Regulation of endothelial cell growth, architecture, and matrix synthesis by TGF-beta. *Am Rev Respir Dis*, 140 (4):1126-1128.
- Roberts AB, Sporn MB. 1993. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors*, 8 (1):1-9.
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, et al. 1986. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 (12):4167-4171.
- Romeis. 1989a. Nachweis organischer Substanzen. In: Böck P, Hrsg. *Mikroskopische Technik*. 17te Aufl. München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg, 443.
- Romeis. 1989b. Untersuchung des Binde- und Stützgewebes. In: Böck P, Hrsg. *Mikroskopische Technik*. Aufl. München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg, 522.
- Rüther A. 1999. Strukturelle Beschaffenheit und Anordnung kraftaufnehmender Elemente in langen Sehnen [Dr]. Bochum: Ruhr-Universität Bochum.
- Salvesen HB, Gulluoglu MG, Stefansson I, Akslen LA. 2003. Significance of CD 105 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *Apmis*, 111 (11):1011-1018.
- Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A, Noda M. 2000. SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem*, 275 (15):10738-10744.
- Sharma P, Maffulli N. 2006. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 6 (2):181-190.
- Stevens A, Lowe J. 1997. Supportzellen und extrazelluläre Matrix. In: Stevens A, Hrsg. *Histologie des Menschen*. 2te Aufl. Weinheim: Chapman & Hall GmbH, 50-64.
- Stolt CC, Lommes P, Sock E, Chaboissier MC, Schedl A, Wegner M. 2003. The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev*, 17 (13):1677-1689.
- Sunassee K, Vile R. 1997. Hitting cancer where it hurts. *Curr Biol*, 7 (5):R282-285.
- Tepliashin AS, Korzhikova SV, Sharifullina SZ, Chupikova NI, Rostovskaia MS, Savchenkova IP. 2005. [Characteristics of human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue]. *Tsitologiya*, 47 (2):130-135.
- Tete S, Mastrangelo F, Grimaldi S, Costanzo G, Salini L, Speranza L, Patruno A, Grilli A, Stuppia L, Dolci M, Dolci G. 2006. Immunohistochemical evaluation of CD31 in human cystic radicular lesions and in keratocysts. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 19 (2(S)):39-45.

- Theodosiou NA, Tabin CJ. 2005. Sox9 and Nkx2.5 determine the pyloric sphincter epithelium under the control of BMP signaling. *Dev Biol*, 279 (2):481-490.
- Thordarson DB, Schmotzer H, Chon J, Peters J. 1995. Dynamic support of the human longitudinal arch. A biomechanical evaluation. *Clin Orthop Relat Res*, (316):165-172.
- Trnka HJ. 2004. Dysfunction of the tendon of tibialis posterior. *J Bone Joint Surg Br*, 86 (7):939-946.
- Van Boerum DH, Sangeorzan BJ. 2003. Biomechanics and pathophysiology of flat foot. *Foot Ankle Clin*, 8:419-430.
- Vogel KG, Ordog A, Pogany G, Olah J. 1993. Proteoglycans in the compressed region of human tibialis posterior tendon and in ligaments. *J Orthop Res*, 11 (1):68-77.
- Waggett AD, Ralphs JR, Kwan AP, Woodnutt D, Benjamin M. 1998. Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol*, 16 (8):457-470.
- Wamhoff BR, Bowles DK, Owens GK. 2006. Excitation-transcription coupling in arterial smooth muscle. *Circ Res*, 98 (7):868-878.
- Wang JM, Kumar S, van Agthoven A, Kumar P, Pye D, Hunter RD. 1995. Irradiation induces up-regulation of E9 protein (CD105) in human vascular endothelial cells. *Int J Cancer*, 62 (6):791-796.
- Wegner M. 1999. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res*, 27 (6):1409-1420.
- Wegner M, Stolt CC. 2005. From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci*, 28 (11):583-588.
- Westphal JR, Willems HW, Schalkwijk CJ, Ruiter DJ, De Waal RM. 1993. Characteristics and possible function of endoglin, a TGF-beta binding protein. *Behring Inst Mitt*, (92):15-22.
- Wikstrom P, Lissbrant IF, Stattin P, Egevad L, Bergh A. 2002. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *Prostate*, 51 (4):268-275.
- Winter GM, Poole CA, Ilic MZ, Ross JM, Robinson HC, Handley CJ. 1998. Identification of distinct metabolic pools of aggrecan and their relationship to type VI collagen in the chondrons of mature bovine articular cartilage explants. *Connect Tissue Res*, 37 (3-4):277-293.
- Wisniewski JR, Schwanbeck R. 2000. High mobility group I/Y: multifunctional chromosomal proteins causally involved in tumor progression and malignant transformation (review). *Int J Mol Med*, 6 (4):409-419.
- Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, Koopman P. 1995. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet*, 9 (1):15-20.
- Yang EY, Moses HL. 1990. Transforming growth factor beta 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J Cell Biol*, 111 (2):731-741.
- Yeap JS, Singh D, Birch R. 2001. Tibialis posterior tendon dysfunction: a primary or secondary problem? *Foot Ankle Int*, 22 (1):51-55.
- Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V, De Crombrughe B. 1997. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn*, 209 (4):377-386.
- Zwipp H, Rammelt S. 2006. [Modified Evans osteotomy for the operative treatment of acquired pes planovalgus]. *Oper Orthop Traumatol*, 18 (2):182-197.
- Zwipp H, Dahlen C, Amlang M, Rammelt S. 2000. [Injuries of the tibialis posterior tendon: diagnosis and therapy]. *Orthopade*, 29 (3):251-259.

## **13. Anhang**

### **13.1. Ehrenwörtliche Erklärung**

#### **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

PD Dr. med. R. Fuhrmann

Prof. Dr. med. R.W. Kinne

PD Dr. Dr. J. Mollenhauer,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 31.01.2007

Rebecca Willinghöfer

## **13.2. Lebenslauf**

### **Willinghöfer, Rebecca**

11.05.1982	Paderborn (D)
1988-1992	Mariengrundschule, Paderborn
1992-2001	Reismann-Gymnasium, Paderborn
2001	Allgemeine Hochschulreife
2001- (2003, September	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller- Universität Jena Ärztliche Vorprüfung)

Jena, 31.01.2007

Rebecca Willinghöfer

### **13.3. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. R.A. Venbrocks, Direktor des Waldkrankenhauses Rudolf-Elle, Klinik für Orthopädie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, danke ich für die Überlassung des Themas als Dissertation.

Frau PD. Dr. R. Fuhrmann danke ich für ihre freundliche und hilfreiche Betreuung dieser Arbeit, ihre konstruktive Kritik bei der Durchsicht des Manuskriptes und ihre stetige Unterstützung bei meinen Bemühungen, den Bezug zwischen den im Labor gewonnenen Erkenntnissen und der klinischen Problematik herzustellen.

Ich danke weiterhin PD. Dr. Dr. Mollenhauer für die theoretische und praktische Betreuung im Labor, die es mir v.a. in der Anfangsphase der Arbeit leicht gemacht hat, den Zugang zum wissenschaftlichen Arbeiten zu finden.

Ebenso möchte ich Prof. Dr. med. R.W. Kinne für die Unterstützung bei der Erstellung des Manuskriptes danken.

Ganz herzlich möchte ich den Mitarbeitern und Doktoranden des Forschungslabors des Rudolf-Elle-Krankenhauses in Eisenberg danken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und ohne die diese Dissertation niemals möglich gewesen wäre: A. Galonska, R. Illgen, N. Kröger, C. Müller, C. Mollenhauer, J. Neuwirth, A. Rüttger, J. Schoenburg, A. Veit und Dr. Stonans. Ebenso möchte ich Frau Troeber für ihre Hilfe in der Bibliothek danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Jan, die mir immer den Rücken frei gehalten haben, für ihre Geduld und Unterstützung, die hilfreiche Kritik, ihr Verständnis und die unermüdliche Motivation, unabhängig davon wie groß die Entfernung war. Dafür und für die langjährige finanzielle Unterstützung meiner Eltern, die mein Studium und damit auch diese Arbeit erst ermöglichten, möchte ich ganz herzlich danken.